

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-504502

(43)公表日 平成11年(1999)4月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 12 N 15/09  
5/10  
7/00  
// (C 12 N 15/09  
C 12 R 1:92)

識別記号  
ZNA

F I  
C 12 N 15/00  
7/00  
C 12 N 5/00  
B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)

(21)出願番号 特願平8-522091  
(86) (22)出願日 平成8年(1996)1月19日  
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)7月18日  
(86)国際出願番号 PCT/FR96/00088  
(87)国際公開番号 WO96/22378  
(87)国際公開日 平成8年(1996)7月25日  
(31)優先権主張番号 95/00747  
(32)優先日 1995年1月20日  
(33)優先権主張国 フランス(FR)  
(31)優先権主張番号 95/06532  
(32)優先日 1995年6月1日  
(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ローヌ-ブーラン・ロレ・エス・アーフ  
フランス国、エフ-92160・アントニー、  
アブニユ・レイモン-アロン、20  
(72)発明者 ドウデュー、ジヤン-フランソワ  
フランス国、エフ-75010・パリ、ケ・ド  
ウ・ジュマツブ、84  
(72)発明者 ラツタ、マルティーヌ  
フランス国、エフ-94220・シヤロントン  
ール-ポン、リュ・ドウ・パリ、141  
(72)発明者 オルシニ、セシル  
フランス国、エフ-75012・パリ、リュ・  
ドウ・ラ・ブウト、19  
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換えアデノウイルスの製造用細胞

(57)【要約】

この発明は、読み取り枠ORF6をもつアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を機能プロモーターの制御下で細胞ゲノムに挿入した、欠損アデノウイルス製造に使用可能な細胞に関する。

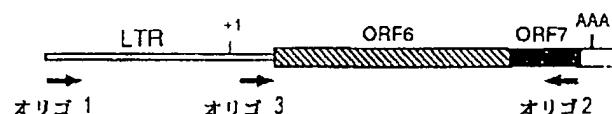


Figure 4A



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/86, 15/34, 5/10, 7/04, C07K 14/075</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 95/02697</b> (43) Date de publication internationale: 26 janvier 1995 (26.01.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00851		(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 8 juillet 1994 (08.07.94)			
(30) Données relatives à la priorité: 93/08596 13 juillet 1993 (13.07.93) FR 94/04590 18 avril 1994 (18.04.94) FR			
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacepede, F-75005 Paris (FR).			
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).			

(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUS VECTORS AND USE THEREOF IN GENE THERAPY

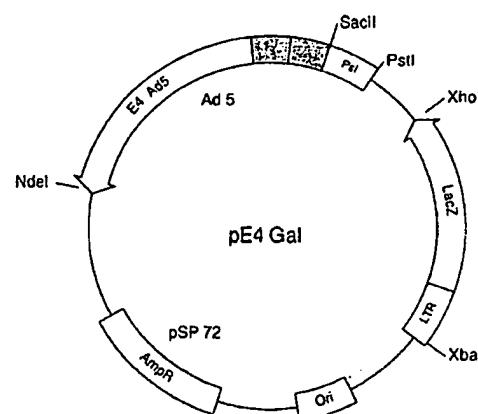
(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRAUX DEFECTIFS ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

## (57) Abstract

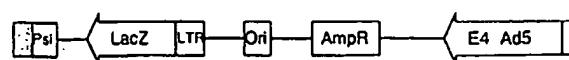
Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and the use thereof in gene therapy, are disclosed.

## (57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique.



X  
H2di808



**CELLS FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRUSES****Publication number:** JP11504502 (T)**Publication date:** 1999-04-27**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- International: C12N15/09; C07K14/075; C12N5/10; C12N7/00; C12N7/04;  
C12N15/00; C12N15/34; C12N15/861; C12N15/864;  
C12R1/92; C12N15/09; C07K14/005; C12N5/10; C12N7/00;  
C12N7/04; C12N15/00; C12N15/34; C12N15/861;  
C12N15/864; (IPC1-7): C12N15/09; C12N5/10; C12N7/00;  
C12N15/09; C12R1/92

- European: C07K14/075; C12N7/04A; C12N15/861; C12N15/864A

**Application number:** JP19960522091T 19960119**Priority number(s):** WO1996FR00088 19960119; FR19950000747 19950120;  
FR19950006532 19950601; FR19950010541 19950908**Also published as:**

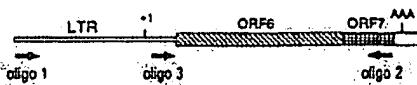
- WO9622378 (A1)
- US6127175 (A)
- SK99097 (A3)
- NO320382 (B1)
- NO320382 (B1)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 11504502 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9622378 (A1)**

The invention relates to cells usable for the production of defective adenoviruses comprising, inserted into their genome, a portion of the region E4 of an adenovirus genome carrying the reading phase ORF6 under the control of a functional promoter.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-504502

(43)公表日 平成11年(1999)4月27日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 15/09

5/10

7/00

// (C 12 N 15/09

C 12 R 1:92)

識別記号

Z N A

F I

C 12 N 15/00

7/00

C 12 N 5/00

Z N A A

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁)

(21)出願番号 特願平8-522091  
(86) (22)出願日 平成8年(1996)1月19日  
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)7月18日  
(86)国際出願番号 PCT/FR96/00088  
(87)国際公開番号 WO96/22378  
(87)国際公開日 平成8年(1996)7月25日  
(31)優先権主張番号 95/00747  
(32)優先日 1995年1月20日  
(33)優先権主張国 フランス(FR)  
(31)優先権主張番号 95/06532  
(32)優先日 1995年6月1日  
(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 ローヌーブーラン・ロレ・エス・アー  
フランス国、エフ-92160・アントニー、  
アブニユ・レイモン-アロン、20  
(72)発明者 ドウデュー、ジヤン-フランソワ  
フランス国、エフ-75010・パリ、ケ・ド  
ウ・ジュマツブ、84  
(72)発明者 ラツタ、マルティーヌ  
フランス国、エフ-94220・シャロントン  
ール-ポン、リュ・ドウ・パリ、141  
(72)発明者 オルシニ、セシリ  
フランス国、エフ-75012・パリ、リュ・  
ドウ・ラ・ブウト、19  
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換えアデノウイルスの製造用細胞

(57)【要約】

この発明は、読み取り枠ORF6をもつアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を機能プロモーターの制御下で細胞ゲノムに挿入した、欠損アデノウイルス製造に使用可能な細胞に関する。

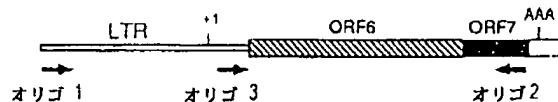


Figure 4A

**【特許請求の範囲】**

1. 読取り枠O R F 6をもつアデノウイルスのゲノムのE 4領域の一部を機能プロモーターの制御下に細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。
2. E 4領域の前記部分が読取り枠O R F 6及びO R F 6／7を含むことを特徴とする請求項1に記載の細胞。
3. E 4領域の前記部分がC亜属のヒトアデノウイルスのゲノムに由来することを特徴とする請求項1又は2に記載の細胞。
4. E 4領域がアデノウイルスA d 2又はA d 5のゲノムに由来することを特徴とする請求項3に記載の細胞。
5. プロモーターが誘導型プロモーターであることを特徴とする請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞。
6. プロモーターがMM T Vプロモーター及びその誘導体から選択されることを特徴とする請求項5に記載の細胞。
7. E 4領域の前記部分が特異的リガンドの認識に関与する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合された読取り枠O R F 6を含むことを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記

載の細胞。

8. 前記ドメインがグルココルチコイドレセプターのホルモン結合ドメイン(H B D-G C R)であることを特徴とする請求項7に記載の細胞。
9. その特異的リガンドの認識に関与する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合される読取り枠O R F 6がグルココルチコイドに応答する誘導型プロモーターの制御下におかれることを特徴とする請求項8に記載の細胞。
10. 前記プロモーターがG R E 5プロモーターであることを特徴とする請求項9に記載の細胞。
11. E 1領域をトランス相補する細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。
12. 293細胞系に由来することを特徴とする請求項11に記載の細胞。

13. K B、HeLa、MDCK、Vero又はgmDBP6細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。

14. 初代培養細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。

15. Ad5のゲノムのヌクレオチド34115～32490に対応するBg1I I-Bg1I Iフラグメントを細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。

16. 293細胞系の細胞であることを特徴とする請求項15に記載の細胞。

17. プラスミドpORF6Genにより形質転換された293系の細胞であることを特徴とする請求項15又は16に記載の細胞。

18. Ad5のゲノムのヌクレオチド34115～33126に対応するBg1I I-PvuIIフラグメントを細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。

19. その末端の一方でグルココルチコイドレセプターのホルモン結合ドメインに融合されたアデノウイルスゲノムの読み取り枠ORF6を含むキメラ遺伝子を細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。

20. プラスミドpGG0により形質転換された293系の細胞であることを特徴とする請求項19に記載の細胞。

21. 読取り枠ORF6をもつアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を誘導型プロモーターの制御下に含むプラスミド。

22. アデノウイルスゲノムのE4領域の前記部分が読み取り枠ORF6及びORF6/7をもつことを特徴とする請求項21に記載のプラスミド。

23. プラスミドpORF6Genであることを特徴とする請求項22に記載のプラスミド。

24. 読取り枠ORF6が特異的リガンドの認識に関与する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合されることを特徴とする請求項21に記載のプラスミド。

25. プラスミド p G G O であることを特徴とする請求項24に記載のプラスミド。

26. 少なくとも E 4 領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造のための請求項1から20のいずれか一項に記載の細胞の使用。

27. 少なくとも E 4 領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造方法であって、前記組換え欠損アデノウイルスのゲノムの種々の領域を付与する1種以上のプラスミドで請求項1から20のいずれか一項に記載の培養細胞を形質転換させた後、産

生されたウイルスを回収することを特徴とする前記方法。

28. E 1 及び E 4 領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造のための請求項27に記載の方法。

29. 培養細胞が請求項15から20のいずれか一項に記載の培養細胞であることを特徴とする請求項27又は28に記載の方法。

30. 請求項27から29のいずれか一項に記載の方法により得られる精製組換え欠損アデノウイルスストック。

31. E 1 領域の全部又は一部の欠失と、E 4 領域のヌクレオチド34801～34329及び34115～33126の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ORF3, ORF6。

32. E 1 領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠ORF1を除くE 4 領域の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ΔE4, ORF1。

33. E 1 領域における欠失と、5'末端が読み取り枠ORF7に含まれ且つ3'末端が読み取り枠ORF2内に位置するフラグメントの欠失を含むことを特徴とする請求項32に記載の組換え欠損アデノウイルス。

34. E 4 領域にヌクレオチド33093～35053の欠失を含むことを特徴とする請求項33に記載の組換え欠損アデノウイルス。

35. E 1 領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠ORF4を除くE 4 領域の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ΔE4, ORF4。

36. E 1 領域における欠失と、5' 末端が読取り枠ORF7に含まれ且つ3'末端が読取り枠ORF6内に位置するフラグメントの欠失と、5' 末端が読取り枠ORF3に含まれ且つ3末端が読取り枠ORF1又はE 4 プロモーター領域内に位置するフラグメントの欠失を含むことを特徴とする請求項3 5に記載の組換え欠損アデノウイルス。

37. E 1 領域における欠失と、ヌクレオチド33093(Sma I)～33695の欠失と、ヌクレオチド34634～35355(Sma I)の欠失を含むことを特徴とする請求項3 6に記載の組換え欠損アデノウイルス。

38. E 1 領域の全部又は一部の欠失と、ヌクレオチド32720～35835、33466～35355又は33093～35355の欠失から選択されるE 4 領域の全体に及ぶ欠失を

含む組換え欠損アデノウイルス△E 1, △E 4。

39. 組換えAAVの製造のための請求項1から20のいずれか一項に記載の細胞の使用。

40. 少なくとも読取り枠ORF6を含むアデノウイルスゲノムのE 4 領域の全部又は一部を細胞ゲノムに挿入して含む細胞の請求項3 9に記載の使用。

41. 少なくとも読取り枠ORF6を含むアデノウイルスゲノムのE 4 領域の一部を細胞ゲノムに挿入して含む培養細胞に、AAV-ITRに挟まれた着目核酸をもつAAVプラスミドと、ヘルパーアデノウイルスと、AAV-Rep及びCap機能とを導入し、その後、產生されたウイルスを回収することを特徴とする組換えAAVの製造方法。

42. 培養細胞がE 4 領域の全体を含む培養細胞であることを特徴とする請求項4 1に記載の方法。

43. 培養細胞が読取り枠ORF6と場合により読取り枠ORF6/7を含む培養細胞であることを特徴とする請求項4 1に記載の方法。

44. 培養細胞が請求項1から20のいずれか一項に記載の培養細胞であることを特徴とする請求項4 3に記載の方法。

45. ヘルパー・アデノウイルスがE4領域を欠損するヒトアデノウイルスであることを特徴とする請求項41に記載の方法。

46. ヘルパー・アデノウイルスがE1及びE4領域を欠損するヒトアデノウイルスであることを特徴とする請求項45に記載の方法。

47. 欠損ヘルパー・アデノウイルスが好ましくはCAV2株から選択されるイヌアデノウイルスであることを特徴とする請求項41に記載の方法。

48. 前記rep及びcap機能が、AAVrep及びcap領域をもつプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることにより付与されることを特徴とする請求項41に記載の方法。

49. プラスミドが核酸集密化剤とカチオン脂質の存在下でトランスフェクトされることを特徴とする請求項41に記載の方法。

50. アデノウイルスのE1及びE4機能をトランス相補する培養細胞に、AAV-ITRに挟まれた着目核酸をもつAAVプラスミドと、AAVrep及びcap領域をもつプラスミドをポリカチオン脂質と集密化剤の存在下で同時トランスフェクトし、E1領域及びE4を欠損するAd2又はAd5由来の

ヒトアデノウイルスとCAV2由来のイヌアデノウイルスから選択されるヘルパー・アデノウイルスを前記培養細胞に同時感染させ、その後、產生されたウイルスを回収することを特徴とする組換えAAVの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 組換えアデノウイルスの製造用細胞

本発明は組換え欠損アデノウイルスの製造に使用可能な新規細胞系に関する。本発明はこれらの細胞系で製造した精製ウイルス調製物と、その構築を可能にするプラスミドにも関する。より詳細には、本発明による新規細胞系はE4領域のトランス相補と、特にE4領域の全部又は一部を欠損する組換えアデノウイルスの高力価のクローンの製造を可能にする。

アデノウイルスは遺伝子治療で遺伝子導入ベクターとして使用するのに特に有利な所定の性質をもつ。特に、アデノウイルスは宿主範囲が非常に広く、休止細胞に感染することができ、感染細胞のゲノムに取込まれず、今日までヒトで重要な疾病に関連付けられていない。従って、アデノウイルスは着目遺伝子を筋肉（Ragotら, *Nature* 361 (1993) 647）、肝臓（Jafféら, *Nature genetics* 1 (1992) 372）、神経系（Akliら, *Nature genetics* 3 (1993) 224）等に導入するため使用されている。

アデノウイルスは約36kbの寸法の直鎖2本鎖DNAをも

つウイルスである。そのゲノムは特に、各末端の逆方向反復配列と、被包化配列（Psi）と、初期遺伝子と、後期遺伝子を含む（図1参照）。主要な初期遺伝子はE1、E2、E3及びE4領域に含まれる。このうちでE1領域に含まれる遺伝子は特にウイルス増殖に必要である。主要な後期遺伝子はL1～L5領域に含まれる。アデノウイルスAd5のゲノムは完全に配列決定されており、データベース上で利用できる（特にGenbank M73260参照）。同様に、他のアデノウイルスゲノム（Ad2、Ad7、Ad12等）も部分的又は完全に配列決定されている。

遺伝子治療で使用するためにアデノウイルスに由来する種々のベクターが製造され、種々の遺伝子（ $\beta$ -gal、OTC、 $\alpha$ -1AT、サイトカイン等）が組込まれている。これらの構築物の各々でアデノウイルスは感染細胞で複製できないように改変されている。例えば、従来技術に記載されている構築物は、ウイル

ス複製に必須のE 1領域を欠失し、このレベルに異種DNA配列を挿入したアデノウイルスである (Levreroら, Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhuryら, Gene 50 (1986) 161)。これら

のアデノウイルスは、アデノウイルスのゲノムの一部を組込んだ相補系 (293系) で產生される。より詳細には、293系は、左側LTR、被包化領域、E 1a, E 1bを含むE 1領域、pIXタンパク質をコードする領域及びpIVa2タンパク質をコードする領域の一部を含むアデノウイルス血清型5 (Ad5) のゲノムの左側末端 (約11~12%) を含む。この系はE 1領域を欠損即ちE 1領域の全部又は一部を欠失する組換えアデノウイルスをトランス相補することができ、高力価をもつウイルスストックを製造することができる。しかし、E 1領域を欠損するベクター (第1世代と呼ばれるベクターE 1) は治療用としてはいくつかの欠点がある。殊に、特に所定のトランス相補細胞機能の存在により、全くインビオ複製できないという訳ではない。例えば、胎児性癌細胞F9でE 1のトランス相補活性が検出されている (Imperialiら, Mol. Cell. Biol. 4, 1984, 867~874)。インターロイキン-6により調節される同種の活性も検出されている (Spergelら, J. Virol. 66, 1992, 1021~1030)。これらのベクターに付随する他の欠点は多数のウイルス遺伝子の存在であり、このような遺伝子は遺

伝子導入後にインビオ発現され、免疫及び／又は炎症応答を誘導する恐れがある。

これらの欠点を解消するために、アデノウイルスのゲノムに他の欠失又は改変を導入することも提案されている。例えば、突然変異株ts125に熱感受性点突然変異を導入し、72kDaのDNA結合タンパク質(DBP)を不活化させている (Van der VlietとSussenbach, Virology 67, 1975, 415~426)。これらのベクターは293系の細胞でも許容温度 (32°C) で高力価で產生されている。しかし、この型のベクターに

も、E 4 領域のインビボ過剰発現、点突然変異の存在による復帰突然変異や、37 °Cでの部分的活性の危険等のいくつかの欠点がある。

これらの問題を解決する別のアプローチは、ウイルス複製及び／又は増殖に必須の別の領域の欠失である。この点で、出願人は E 4 領域に特に着目した。E 4 領域は実際に後期遺伝子の発現の調節、後期核RNAの安定性、宿主細胞タンパク質の発現の消滅及びウイルスDNAの複製の効力に関与している。従って、E 1 及び E 4 領域を欠失するアデノウイルスベクターは転写バックグラウンドノイズとウイルス遺伝子発現が非常に低

い（特に国際出願第PCT/FR94/00851号参照）。しかし、このようなベクターを工業的に及び治療的に構築及び利用するには、ウイルスストックを製造するためにこれらの2つの機能の有効なトランス相補系を入手できなければならない。

本発明はこの問題を解決する。本発明は実際に、E 4 領域のトランス相補を可能にすると共に、この領域を欠損する組換えアデノウイルスを高力価でクローン製造できる細胞系を提供する。本発明による細胞系は2つの機能E 1 及びE 4 をトランス相補することができるという利点があるため、これらの2機能を欠損するウイルスを産生することができる。本発明はこれらの細胞系の構築を可能にするプラスミド、組換え欠損ウイルスの製造方法及び精製ウイルスストックにも関する。より詳細には、出願人はE 4 領域の一部のみを導入することにより、E 4 領域を有效地にトランス相補することが可能な産生系が得られることを今般立証した。例えば、読み取り枠ORF6又は読み取り枠ORF6及びORF6/7に対応するE 4 領域の小機能ユニットのみを減らすと、特に有利な性質をもつ系が得られる。

従って、本発明の第1の目的は読み取り枠ORF6を含むアデノウイルスゲノムのE 4 領域の一部を機能プロモーターの制御

下にそのゲノムに挿入した、組換え欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞である。好適態様によると、本発明の細胞は読み取り枠ORF6及びORF6/7

を含むアデノウイルスゲノムのE 4領域の一部を機能プロモーターの制御下に含む。

上述のように、本発明による細胞系は特に有利な性質をもつ。まず第1にE 1及びE 4機能のトランス相補を可能にする。他方、特に有利な点として、これらの機能を欠損するウイルスのplaques形成を誘導することができ、これは組換えウイルスのクローニングと、その増幅及び精製に不可欠である。この点で、出願人は実際にE 4領域の全体、又は例えば読み取り枠ORF 4を含むもっと大きい機能ユニット、をもつ細胞系がE 4領域を欠損するウイルスplaquesを形成できないことを立証した。E 4領域に固有の機能ユニットの同定により、E 1及びE 4機能を欠損するウイルスの非常に有効なトランス相補及び産生系を作製することができる。本発明による細胞系の他の利点は特に、E 1及びE 4領域を欠損するこのようなウイルスを液体培地で増幅することができ、産生されるウイルスが高力価であり、汚染性の複製ウイルス粒子が産生されないことである。

アデノウイルスゲノムのE 4領域はORF 1、ORF 2、O

RF 3、ORF 4、ORF 3/4、ORF 6及びORF 6/7と呼ばれる7個の読み取り枠から構成される(図2及び3)。上述のように、本発明の細胞は読み取り枠ORF 6と場合により読み取り枠ORF 6/7を含むこの領域の一部のみが存在することを特に特徴とする。特に重要な点として、本発明の細胞に存在するE 4領域の部分は機能的読み取り枠ORF 4を含まない。本発明の細胞に存在するE 4領域は機能的読み取り枠ORF 1~ORF 4を含まないほうが有利である。本発明の細胞に存在するE 4領域は読み取り枠ORF 1~ORF 4の少なくとも一部を欠失していると特に好ましい。E 4領域のこれらの各部分は当業者に公知の方法により酵素切断してもよいし、修飾してもよい。1好適態様によると、本発明の細胞系は読み取り枠ORF 6及び場合によりORF 6/7の全体を含むアデノウイルスゲノムのE 4領域の2kb未満を含む挿入フラグメントを含む。好適例として、読み取り枠ORF 6はヌクレオチド34115~33126に対応するBg 1 I-Pvu II フラグメントとしてE 4領域から単離することができ、読み取り枠ORF 6-ORF 6/7はAd 5のゲノムのヌクレオチド34115~3249

## 0に対応するB g l I I - B g l I I フラグメントとしてE 4 領

域から単離することができる。本発明の特定態様によると、読み取り枠O R F 6はその特異的リガンドの認識に関する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合される。グルココルチコイドレセプター (G C R : Hollenbergら, 1985, Nature, 318, 635~341) のホルモン結合ドメイン (HBD : Hormone Binding Domain) は、細胞質タンパク質hsp90及び他の補因子 (S. P. BOHENら, 1995, Science, 268, 1303~1304)との相互作用が安定しているため、ホルモンの不在下で融合タンパク質を細胞の細胞質コンパートメント内に保持できる (T. MATTIONIら, 1994, Methods in Cell Biology, 第16章, 335~352)ので、HBD (G C R) を選択すると特に有利である。こうしてホルモンの存在は細胞質の融合タンパク質の核内転位をもたらし、核コンパートメント内でE 4 のO R F 6活性の機能を発揮できる。ホルモンを加えると、ハイブリッドタンパク質のトランスコンホーメーション変化により活性O R F 6の機能ドメインの「露呈」をもたらすこともできる。

この点で、本発明の特に好適な態様は、A d 5のゲノムのヌ

クレオチド34115~32490に対応するB g l I I - B g l I I フラグメントをそのゲノムに挿入した細胞により構成される。このフラグメントは特に、クローン#2細胞系の構築に使用される実施例に記載するプラスミドp O R F 6 G e nに存在する。本発明の特に好適な別の態様は、A d 5のゲノムのヌクレオチド34115~33126に対応するB g l I I - P v u I I フラグメントをそのゲノムに挿入した細胞により構成される。本発明の別の態様では、少なくとも領域O R F 6はそのC末端 (融合体G C R-O R F 6) 又はN末端 (融合体O R F 6-G C R) でG C RのHBDに結合している。C末端融合の場合には、O R F 6及びO R F 7をコードするウイルスの配列は、G C RのHBDを表す配列の下流に翻訳段階で挿入すると有利である。この特定態様では、その後、キメラ遺伝子の発現により一次R N Aが産生され、その翻訳産物がG C R-O R F 6タ

ンパク質（配列番号7）である。この転写物の代替スプライシングにより、融合タンパク質G C R - O R F 6 / 7をコードするメッセンジャーR N Aが生成される（実施例1. 5参照）。

本発明による細胞に存在するE 4領域の部分は、種々の起源

又は血清型のアデノウイルスに由来し得る。実際に、構造と性質は多少異なるが、類似の遺伝子構成をもつ種々の血清型のアデノウイルスが存在する。より詳細には、本発明による細胞に存在するE 4領域はヒト又は動物起源のアデノウイルスに由来し得る。

ヒト起源のアデノウイルスについては、C亜属に分類されるものを好適例として挙げることができる。種々の血清型のヒトアデノウイルスのうちでは、本発明の範囲内では2又は5型のアデノウイルス（A d 2又はA d 5）を使用すると一層好ましい。動物起源の種々のアデノウイルスのうちでは、本発明の範囲内ではイヌ起源のアデノウイルス、特に全アデノウイルスC A V 2株〔例えばマンハッタン株又はA 2 6 / 6 1（A T C C VR-800）〕を使用するのが好ましい。他の動物起源のアデノウイルスは、参考として本明細書の一部に組み込まれる国際公開第WO 94 / 26914号に特に記載されている。

本発明の1好適態様では、E 4領域の部分はC亜属のヒトアデノウイルスのゲノムに由来する。アデノウイルスA d 2又はA d 5のゲノムに由来するものが特に好ましい。

上述のように、本発明の細胞に存在するE 4領域の部分は、

これらの細胞中で機能するプロモーターの制御下におかれ。プロモーターとしては、これらの遺伝子の発現レベル及び／又は期間を制御することが可能な誘導型プロモーターが有利である。デキサメタゾンにより誘導されるM M T V L T Rプロモーター（P h a r m a c i a）又はテトラサイクリンにより調節されるプロモーター（WO 94 / 29442； WO 94 / 04672）が特に有利である。他のプロモーターも当然使用することができ、特に例えば異種調節領域（特に「エンハンサー」領域）をもつM M T V L T Rの変異体が挙げられる。

特定様では、ハイブリッド遺伝子の発現は細胞質内の融合タンパク質の構成的蓄積を避けるため、又は核コンパートメントへの「漏れ」と所定の細胞毒性を最小限にすることによって調節されたプロモーターの制御下におかれる。より特定的な様では、キメラ遺伝子はGRE5プロモーター(S. MaderとJ. White, 1993, PNAS, 90, 5603~5607; 実施例1. 5参照)等のグルココルチコイドに応答する誘導型プロモーターの制御下におかれる。

本発明による細胞は医薬的に使用可能な種々の細胞即ち工業的に許容可能な条件下で培養可能であり且つ公知病原性をもた

ない種々の細胞から作製することができる。このような細胞としては、樹立細胞系又は初代培養物、特にヒト胎児性網膜細胞が挙げられる。アデノウイルスにより感染可能なヒト由来の細胞が有利である。この点では、KB、HeLa、293、Vero、gMDP6等の細胞が挙げられる。

KB系細胞はヒト表皮癌腫に由来する。該細胞とその培養条件はATCC(CCL17参照)から入手できる。ヒトHeLa細胞系はヒト上皮癌腫に由来する。該細胞とその培養条件もATCC(CCL2参照)から入手できる。293系細胞はヒト胎児性腎細胞である(Grahamら, J. Gen. Virol. 36(1977)59)。この系は特にヒトアデノウイルスAd5のゲノムの左側部分(12%)をそのゲノムに組込んでいる。gMDP6細胞系(Brougheら, Virology 190(1992)624)はMMTV-LTRの制御下にアデノウイルスの遺伝子E2をもつHeLa細胞から構成される。

細胞は、イヌ起源の細胞(BHK、MDCK等)でもよい。この点では、イヌMDCK系の細胞が好ましい。MDCK細胞の培養条件は特にMacatneyら, Science 44

(1988)9に記載されている。

本発明による細胞系は種々の方法で構築することができる。一般には、機能プロモーターの制御下にE4領域の選択フラグメントをもつプラスミドで細胞培養物を形質転換されることにより作製する。細胞のトランسفエクションは当業者

に公知の任意の方法で実施することができ、特にリン酸カルシウムの存在下でエレクトロポレーション等により実施できる。特定様態によると、使用されるプラスミドは形質転換細胞を同定及び選択することが可能なマーカー遺伝子ももつ。マーカー遺伝子としては特に任意の抗生物質（ゲネチシン、ハイグロマイシン等）耐性遺伝子が挙げられる。マーカー遺伝子はプラスミドと同時トランスフェクトする別の構築物にも含まれてもよい。トランスフェクション及びマーカー遺伝子の選択後、得られた細胞がE4領域を欠失するアデノウイルスをトランス相補する能力について選択する。このためには、E4領域の種々の部分を欠損する種々の突然変異アデノウイルスを使用することができ、特に実施例に記載するようなアデノウイルスAd2d1808 (WeinbergとKetner, J. Virol. 57 (1986) 833)、Ad5d11004、d11007又

はd11014 (BridgeとKetner, J. Virol. 63 (1989) 631)、d11011 (Bridgeら, Virology 193 (1993) 794) を使用できる。

本発明による細胞はE1領域もトランス相補できると有利である。このような細胞は既にE1領域をトランス相補する細胞（例えば293細胞）から上述のように構築することもできるし、E1領域を附加する構築物と本発明によるE4領域の部分を附加する構築物を例えばヒト由来網膜芽細胞に逐次導入して構築することもできる。

特に好適な態様によると、本発明による細胞は293細胞系に由来する。この点では、タンパク質HBD-ORF6及びHBD-ORF6/7をコードするプラスミドpORF6Gen又はプラスミドpGGOにより形質転換した293系の細胞で特に有利な結果が得られた。

本発明は更に、読み取り枠ORF6又はORF6とORF6/7をもつアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を誘導型プロモーターの制御下に含むプラスミド（例えば、特にプラスミドpORF6Gen及びpGGO）の構築にも関する。これらの

プラスミドを直接使用して選択された細胞集団にトランスフェクトし、その後、選択によりE4機能を安定的に獲得した細胞を同定することができる。

本発明の別の目的は、少なくともE4領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造のための上記細胞の使用である。本発明は実際に、上記細胞を利用して少なくともE4領域を欠損する特に有利な組換えアデノウイルスの製造方法を提供する。この方法によると、前記組換え欠損アデノウイルスのゲノムの種々の領域を付加する1以上のプラスミドで上記のような細胞培養物を形質転換させた後、產生されたウイルスを回収する。この方法は、非機能的E1及びE4領域をもつアデノウイルスの製造に特に有利である。このようなアデノウイルスは特に、E1及びE4領域が完全もしくは部分的欠失により不活化又は非機能的にされたベクターである。このような改変は例えば遺伝子工学技術又は突然変異誘発剤で処理することによりインビトロ（単離DNAで）又はその場（in situ）で得られる。遺伝子改変は領域のコーディング部分の内部又はコーディング領域の外部のどちらで行ってもよく、例えば前記遺伝子の発現及び／又は転写調節に関与する領域で行われる。欠失は、慣用

分子生物学技術により適当な制限酵素で消化後に連結することにより実施できる。

特に有利な態様によると、本発明の方法はアデノウイルスAd5の配列上のヌクレオチド454からヌクレオチド3328までのPvuII-BglIIIフラグメントの欠失によりE1領域が不活化された組換えアデノウイルスの製造に使用される。この配列は文献に記載されており、データベース（特にGenbank No. M73260参照）でアクセスできる。別的好適態様では、E1領域はヌクレオチド382～ヌクレオチド3446のHinfI-Sau3Aフラグメントの欠失により不活化される。特定態様では、本発明の方法はE4領域の全部を欠失するベクターを製造することができる。これは、ヌクレオチド35835～32720に対応するMaeII-MscIフラグメントの切出しにより実施できる。本発明による細胞系は実際にE4領域の任意型の欠失又は不活化をもつアデノウイルスをトランス相補及び増幅することが可能である。別の特定

態様では、E 4 の機能部分のみが欠失している。この部分は少なくとも読み取り枠 ORF 3 及び ORF 6 を含む。例えば、これらのコーディング枠はヌクレオチド 34801～

34329 及び 34115～33126 に夫々対応する PvuII-A1uI 及び BglII-PvuII フラグメントの形態のゲノムから欠失させることができる。ウイルス Ad2d1808 又はウイルス Ad5 d11004、Ad5 d11007、Ad5 d11011 又は Ad5 d11014 の E 4 領域の欠失も本発明の範囲内で使用することができる。この点では、本発明の細胞は不活性 E 1 領域と、Ad5 d11014 のゲノムに存在する型の E 4 領域における欠失を含むウイルス即ち読み取り枠 ORF 4 を保存する E 4 ウィルスの製造に特に有利である。

従って、本発明はそのゲノムが E 1 領域における欠失と E 4 領域における欠失を含む組換え欠損アデノウイルスにも関する。より詳細には、本発明はそのゲノムが E 1 領域における欠失と、少なくとも読み取り枠 ORF 3 及び ORF 6 に対応する E 4 領域における欠失を含む組換え欠損アデノウイルスに関する。従って、本発明によるアデノウイルスは E 1 及び E 4 領域の全部又は少なくとも一部に関して以下の欠失を含むことが好ましい。

—アデノウイルス Δ E 1, ORF 3, ORF 6 : E 1 領域の全部又は一部の欠失と、E 4 領域のヌクレオチド 3480

1～34329 及び 34115～33126 の欠失；

—アデノウイルス Δ E 1, Δ E 4, ORF<sup>1+</sup> : E 1 領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠 ORF 1 を除く E 4 領域の欠失。E 4 領域におけるこの欠失はヌクレオチド 33093 (Smal)～35053 (AccIII) に及ぶことが好ましい。このような欠失は例えば突然変異体 Ad5 d11004 から得られる。本願に与える情報及び配列番号 4 のヌクレオチド配列に基づき、他の欠失を使用して本発明のアデノウイルス Δ E 1, Δ E 4, ORF<sup>1+</sup> を作製することもできる。この 2 本鎖配列は、E 4 領域とヌクレオチド 32749 (配列番号 4 の 1 位

) ~ 35935 (配列番号4の3186位) の右側 ITR を含むアデノウイルスゲノムの右側部分に相当する。この配列は純粋に例示として示すものであり、他の文献公知の配列も使用できる。E4領域の種々の読み取り枠は、特に ORF7、ORF6、ORF4、ORF3、ORF2 及び ORF1 である。本発明のアデノウイルス  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ ,  $ORF1^+$  は E1 領域における欠失と、5' 末端が読み取り枠 ORF7 に含まれ且つ 3' 末端が読み取り枠 ORF2 内に位置するフラグメントの欠失を含むと有利である。5' 末端がアデノウイルスのゲノムのヌクレオチド

32920~33190 に含まれ且つ 3' 末端がアデノウイルスゲノムのヌクレオチド 34710~35090 に含まれるフラグメントが欠失していると、より好ましい。この欠失は配列番号4ではほぼヌクレオチド 170~440 (5' 末端) 及び 1960~2340 (3' 末端) に対応する。

—アデノウイルス  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ ,  $ORF4^+$  : E1 領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠 ORF4 を除く E4 領域の欠失。本発明のアデノウイルス  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ ,  $ORF4^+$  は E1 領域における欠失と、5' 末端が読み取り枠 ORF7 に含まれ且つ 3' 末端が読み取り枠 ORF6 内に位置するフラグメント (読み取り枠 ORF4 にオーバーラップする部分を除く) の欠失と、5' 末端が読み取り枠 ORF3 に含まれ且つ 3' 末端が読み取り枠 ORF1 又は E4 のプロモーター領域内に位置するフラグメントの欠失を含むと有利である。より好ましくは、本発明によるこれらのアデノウイルスは、

- (i) E1 の全部又は一部の欠失と、
- (ii) 5' 末端がアデノウイルスのゲノムのヌクレオチド 32920~33190 に含まれ且つ 3' 末端がアデノウイルスゲノムのヌクレオチド 33200~34000 に含まれるフ

ラグメントの欠失と、

- (iii) 5' 末端がアデノウイルスのゲノムのヌクレオチド 34360~34700 に含まれ且つ 3' 末端がアデノウイルスゲノムのヌクレオチド 3515

0～35530に含まれるフラグメントの欠失を含む。

配列番号4の配列上の欠失(i i)の対応位置は180～445(5'末端)及び450～1250(3'末端)である。配列番号4の配列上の欠失(i i i)の対応位置は1610～1950(5'末端)及び2410～2870(3'末端)である。

E4領域におけるこれらの欠失はヌクレオチド33093(Sma I)～33695及び34634(Ssp I)～35355(Sma I)に及ぶことが好ましい。これらの欠失は例えば突然変異体Ad5 d11014から得られる。

アデノウイルスΔE1, ΔE4: E1領域の全部又は一部の欠失と、ヌクレオチド32720～35835、33466～35355(この欠失は例えば突然変異体Ad5 d11007から得られる)又は33093～35355(この欠失は例えば突然変異体Ad5 d11011から得られる)の欠失。

これらの3種の欠失は領域4の全体に及ぶ。

上述のように、E1領域における欠失はE1A及びE1B領域の全部又は一部に及ぶことが有利である。この欠失はウイルスが細胞内で自律複製できないようにするために十分でなければならない。本発明のアデノウイルスで欠失しているE1領域の部分はヌクレオチド454～3328又は382～3446に及ぶと有利である。

上記位置は、データベースでアクセス可能な公知の野生型アデノウイルスAd5の配列に基づく。種々の血清型のアデノウイルス間には多少の相違が存在し得るが、これらの位置は任意の血清型、特にアデノウイルスAd2及びAd7から本発明により組換えアデノウイルスを構築するのに一般に適用できる。

更に、本発明のアデノウイルスはそのゲノムのレベルに他の変異をもっていてよい。特に、ウイルスの能力を増加し、ウイルス遺伝子の発現に結び付けられるこれらの副作用を減らすように他の領域を欠失してもよい。例えば、特にE3又はIVa2領域の全部又は一部を欠失してもよい。但し、E3領域については、gp19Kタンパク質をコードする部分は保存しておくと特に有利である。このタンパク質は実際に、ア

デノウイルスベクターが (i) その作用を制限したり (ii) 望ましくない副作用を生じたりするような免疫反応を受けないようにすることができる。特定態様によると、E3領域を欠失させ、g p 19 Kタンパク質をコードする配列を異種プロモーターの制御下に再導入する。

本発明による組換えアデノウイルスは遺伝子治療で使用するのに特に魅力的な性質をもつ。これらのベクターは実際に、非常に高い感染性、安全性（免疫及び／又は炎症反応の危険が激減する）及び遺伝子導入能力を兼備する。更に、本発明の細胞系は汚染性複製粒子（RCA）を全く含まないウイルスストックを製造することができる。その結果、本発明の細胞系はE1及びE4領域を欠損し、RCAを含まないアデノウイルスを構築及び製造することができる。特に、本発明の細胞系では本発明によるウイルスΔE1, ΔE4, ORF1<sup>+</sup>, ΔE1, ΔE4, ORF4<sup>+</sup>又はΔE1, ΔE4の製造時にE4+汚染性複製粒子が出現する恐れがなく、これは、(i) これらのウイルスが細胞のゲノムに組込まれた領域の両側にオーバーラップする配列を含まず（図3）、(ii) 細胞及びウイルス粒子間の単一の相同組換えにより右側ITRを欠損する非生存性ウイル

スが生成されるためである。本発明によるウイルスの別の利点は、クローニング能が増加し、寸法の大きいトランスジーン(>10kb)を挿入できることである。このため、特に転写調節配列を使用できるようになり、発現効率、調節及び期間を改善することができる。更に、ウイルスの使用量を低減でき、細胞変性副作用を激減しながら同等の治療効果が得られる。

上述のように、アデノウイルスは遺伝子及び細胞治療用として非常に有効な遺伝子導入ベクターを構成する。このためには、細胞、臓器又は生物への導入及び／又は発現が必要な異種核酸配列をそのゲノムに挿入すればよい。この配列は、標的細胞で転写及び場合により翻訳されると治療効果をもつ物質を産生する遺伝子等の1種以上の治療遺伝子を含み得る。治療物質としては、特に酵素、血液誘導体、ホルモン、リンホカイン（例えばインターロイキン、インターフェロン、TNF等）（FR9203120）、成長因子、神経伝達物質又はその前駆物質もしくは合成酵素、栄養因子（例えばBDNF、CNTF、NGF、IGF、G

MF、aFGF、bFGF、NT3、NT5等)、アポリポタンパク質(例えばapoA I、apoA IV、apoE等)(WO94/25073)、ジストロフィン又は

ミニジストロフィン(WO93/06223)、腫瘍抑制遺伝子(例えばp53、Rb、Rap1A、DCC、k-ras等)(WO94/24297)、因子VII、VIII、IX等の凝固関連因子をコードする遺伝子、自殺遺伝子(例えばチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ等)、更には天然又は人工免疫グロブリン(Fab、ScFv等、WO94/29446)の全部又は一部等を挙げができる。治療遺伝子は標的細胞で発現されると遺伝子の発現又は細胞mRNAの転写を制御することが可能なアンチセンス遺伝子又は配列でもよい。このような配列はヨーロッパ特許第140308号に記載の方法に従って、例えば標的細胞で細胞mRNAの相補的RNAに転写され、タンパク質への翻訳を阻止することができる。治療遺伝子はワクチン製造の目的では、ヒトで免疫応答を生じることが可能な抗原性ペプチドをコードする遺伝子でもよい。このような遺伝子としては特に、エピスタイン-バールウイルス、HIVウイルス、B型肝炎ウイルス(EP185573)、偽狂犬病ウイルスの特異抗原ペプチド、又は腫瘍特異抗原ペプチド(EP259212)が挙げられる。

一般に、異種核酸配列は感染細胞において機能する転写プロ

モーター領域と、着目遺伝子の3'側に位置し、転写終結シグナル及びポリアデニル化部位を特定する領域も含む。これらの要素が集まって発現カセットを構成する。プロモーター領域については、感染細胞で機能し得るときに着目遺伝子の発現に天然に関与するプロモーター領域である。別の起源の領域でもよい(他のタンパク質の発現に関与する領域でもよいし、合成領域でもよい)。特に、ある遺伝子の転写を特異的又は非特異的及び誘導又は非誘導的に刺激又は抑制する真核もしくはウイルス遺伝子のプロモーター配列又は任意のプロモーターもしくは誘導配列を挙げができる。例えば、感染させたい細胞のゲノム、又はウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列、特にアデノウイルスのE1A、ML

P遺伝子のプロモーター、CMV、LTR-RSVプロモーター等を挙げることができる。真核プロモーターとしては、ユビキチンプロモーター(Hprt、ビメンチン、 $\alpha$ -アクチン、チューブリン等)、中間フィラメント(デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、GAP等)のプロモーター、治療遺伝子プロモーター(MDR、CFTR、VIII因子型等)、組織特異的プロモーター(ピルビン酸キナーゼ、ビリン、脂肪酸結合タンパク質のプロモ

ーター、平滑筋細胞の $\alpha$ アクチンプロモーター、肝臓特異的プロモーター、ApoAI、ApoAII、ヒトアルブミン等)又は刺激応答プロモーター(ステロイドホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター等)を挙げができる。更に、これらの発現配列は活性化配列、調節配列又は組織特異的もしくは優先発現を可能にする配列を加えることにより改変してもよい。また、挿入する核酸が発現配列を含まない場合には、このような配列の下流で欠損ウイルスのゲノムに挿入できる。

更に、異種核酸配列は標的細胞の分泌経路に合成治療物質を導くシグナル配列を特に治療遺伝子の上流に含んでいてもよい。このシグナル配列は治療物質の天然シグナル配列でもよいし、他の任意の機能シグナル配列又は人工シグナル配列でもよい。

治療遺伝子の発現カセットは従来技術に記載された方法に従って組換えアデノウイルスのゲノムの種々の部位に挿入することができる。まず第1に、E1欠失のレベルに挿入することができる。配列の付加又は置換によりE3領域のレベルに挿入してもよい。また、欠失E4領域のレベルに配置してもよい。

本発明による細胞は組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)の製造にも使用できる。これは、本発明の細胞の特に有利な別の

適用である。実際に、これらの細胞から汚染性複製ウイルスを全く含まない高力価のrAAVを得ることができる。従って、本発明は組換えAAVの製造のための、少なくとも読み取り枠ORF6を含むアデノウイルスのゲノムのE4領域の全部又は一部をそのゲノムに挿入した細胞の使用にも関する。細胞は上記のような

ものが有利である。

A A Vは感染細胞のゲノムに安定的且つ部位特異的に組込まれる比較的小寸法のヒトパルボウイルスのファミリーのDNAをもつウイルスである。A A Vは細胞増殖、形態又は分化に影響せずに広範な細胞に感染することができる。また、ヒトで疾病に関与しないと思われる。A A Vのゲノムはクローニングされ、配列及び特性を決定されている。このようなゲノムは約4700塩基を含み、各末端にウイルス複製起点として機能する約145塩基の逆方向反復領域（ITR）を含む。ゲノムの残余は被包化機能をもつ2つの主領域に分けられ、ゲノムの左側はウイルス複製とウイルス遺伝子の発現に関与するr e p遺伝子を含み、ゲノムの右側はウイルスのキャプシドタンパク質をコードするc a p遺伝子を含む。A A Vに由来するベクターを遺伝子のインビトロ及びインビボ導入に使用することは文献

に記載されている（特に国際出願公開第WO91/18088号、同WO93/09239号、米国特許第4,797,368号、同第5,139,941号、ヨーロッパ特許第488528号参照）。組換えA A Vではr e p及びc a p遺伝子は一般に欠失され、着目遺伝子で置換されている。

遺伝子治療ベクターとしてのA A Vの使用を制限する問題の1つは、A A Vが例えばアデノウイルス又はヘルペスウイルス等のヘルパーウイルスに同時感染した細胞でしか有効に複製しないという事実に起因する。従って、組換え欠損A A Vを製造するには、ヘルパーウイルス（例えばアデノウイルス）、A A Vの2つの逆方向反復配列（ITR）に挟まれた着目核酸配列を含むプラスミド、及びA A Vの被包化遺伝子（r e p及びc a p遺伝子）をもつプラスミドの3成分を產生細胞に同時トランスフェクト及び同時感染させなければならない。

このシステムの最大の欠点はヘルパーウイルスを使用することである。ヘルパーウイルスは一般に複製でき、產生r A A Vとの混合物として存在する。従って、ウイルスストックはヘルパーウイルスにより潜在的に汚染され、これらのストックは治療用途に不適合になる。更に、この方法では多数の成分を必要

とするため、得られるウイルスの力価はかなり低く、 $10^8$  のオーダーである。

本発明はこれらの欠点を解決することができる。本発明は実際に、複製ウイルスにより汚染されずに非常に高力価 ( $> 10^{10}$ ) のウイルスストックを得ることができること

ができる。

AAVの複製には、E1A、E1B、E2A、VA及びE4の5種のアデノウイルス遺伝子が必要である。感染性粒子の最適産生には、産生細胞でこれらの遺伝子が存在し且つ発現されなければならない。本発明の方法によると、ここではこれらの遺伝子のいくつか、特にE4領域の全部又は一部と好ましくはE1領域をそのゲノムに既に含んでいる産生細胞系を使用する。この型の細胞系を使用する利点は、感染性粒子を自律的に生成できない欠損ヘルパーアデノウイルスを使用できるようになることである。従って、製造されたrAAVストックは汚染されていない。

実際に、細胞系に組込まれる機能をヘルパーアデノウイルスのゲノムから欠失させることができる。

これは、ヒト由来のヘルパーアデノウイルスの使用に特に有利である。例えばアデノウイルスのE1及びE4機能をトラン

ス相補することが可能な上記のような細胞系では、これらの機能を欠損するヒト由来ヘルパーアデノウイルス（例えばAd5又はAd2）を使用することができる。このようなヘルパーアデノウイルスはrAAVの産生に必須の領域（E1及びE4）を欠くため、方法の効率が著しく制限されるという理由で従来技術の方法では有效地に使用することができなかった。ところが、このようなアデノウイルスは感染性粒子を自律的に生成することができない。このため、rAAVのストックにたまたま存在していても、この調製物の医薬的品質は悪化しない。

従って、動物、好ましくはイヌ由来のヘルパーアデノウイルスをより有效地に使用することも可能になる。

ウイルスストックの製造量に加え、本発明による方法は特に高力価のウイルスを得ることもでき、完全に有利である。これは、本発明による方法の特筆すべき別の性質である。例えば、産生力価はウイルスゲノム  $10^{11}$  個/mL以上にもな

り、従来技術で観察される力価の最高1000倍大きい。これらの結果は全く予期されず、産業収益の点できわめて重要である。これらの結果は、293系に由来し、MMTVプロモーターの制御下でORF6と場合によりORF6/7又はE4の全体を発現

する細胞系（従って、これらの細胞系は構成的に発現されるE1と、E4、又はデキサメタゾンの存在下で条件付きで発現される少なくともORF6を含むE4の一部、を含む）で特に顕著である。

ヘルペーウイルスが全く存在しないとしても、これらの細胞系はAAVウイルスを複製することが可能である。例えばこれらの細胞系に野生型AAVを感染させるか又はこれらの細胞系に感染性プラスミドpAV2 (MacLughlin, Gene, 23, 67~73, 1983) をトランスフェクトすると、AAVのDNAを複製させることができる。複製効率はヘルペアデノウイルスの存在下で得られるよりも確かに劣るが、本発明による細胞の特に顕著な性質を立証する。

本発明による方法を実施するために特に有利な細胞系の1例は、Ad5のゲノムのヌクレオチド34115~32490に対応するBglIII-BglIIIフラグメントをそのゲノムに挿入した293系の細胞である。例えばプラスミドpORF6Gen (実施例参照) により形質転換した293系の細胞がその1例である。

この型の細胞にヘルペアデノウイルス (例えばヒト野生型

表現型、E1欠失、E1及びE4二重欠失又はイヌアデノウイルス) を同時感染させ、着目核酸をランキングするAAVITRをもつプラスミドAAVと、rep及びcap機能をもつプラスミドの2種のプラスミドを同時トランスフェクトすることにより、デキサメタゾンの存在下でAAVウイルスの感染性粒子を高力価で產生させることができる。実施例に示すように、少量の細胞で操作する場合にはゲノム $10^{11}$ 個/m<sup>1</sup>のゲノム力価が得られる。もっと多量の細胞で操作すると、 $10^{12}$ までのより高い力価が得られる。更に、ヘルペーウイルスとして

イヌアデノウイルスを使用することにより、本発明の方法はヒトA dにより汚染されていない高力価のA A Vストックを得ることができる。

従って、本発明の別の目的は、少なくとも読み取り枠O R F 6を含むアデノウイルスのゲノムの領域4の一部をそのゲノムに挿入した培養細胞に、  
- A A VのI T Rを端部にもつ着目核酸をもつA A Vプラスミドと、  
- ヘルパー・アデノウイルスと、  
- A A VのR e p及びC a p機能を導入し、

その後、産生されたウイルスを回収することを特徴とする組換えA A Vの製造方法を提供することである。

特定様態によると、産生細胞はE 4領域の全体を含む細胞である。特に有利な別の様態によると、産生細胞は少なくとも読み取り枠O R F 6と場合により読み取り枠O R F 6/7を含むE 4領域の一部を含む細胞である。アデノウイルスの製造について上記に定義したような細胞が特に好ましい。特に、アデノウイルスのE 1及びE 4機能をトランス相補することが可能な細胞が有利である。好適1例は、E 4領域の全部、又は少なくとも読み取り枠O R F 6と場合により読み取り枠O R F 6/7を含むE 4領域の一部、をそのゲノムに挿入した293系の細胞である。例えばクローン#2 (IGRP2) 及びクローン#4 (IGRP4) 細胞を挙げることができる。

上述のように、ヘルパー・アデノウイルスは野生型表現型、E 1領域欠損、E 1及びE 4二重欠失をもつヒトアデノウイルス又はイヌアデノウイルスのいずれでもよい。本発明による方法の利点は、r A A V力価が非常に高いことと、製造可能なストックの安全性である。従って、感染性粒子を自律的に生成できない欠損ヘルパー・アデノウイルスを使用すると特に有利である。

本発明の方法によるヘルパー・アデノウイルスはE 4領域に欠失をもつヒトアデノウイルスが有利である。E 1及びE 4領域を欠損するヒトアデノウイルスが一層好ましい。別の有利な様態によると、好ましくはC A V 2株から選択されるイヌアデノウイルスを使用する。

本発明による方法では、AAVのrep及びcap機能はAAVのrep及びcap領域をもつプラスミドを細胞に同時トランスフェクトすることにより付与するのが好ましい。これらの領域は相同P5プロモーター又はRSV-LTR等の構成的プロモーターの制御下においてもよい。これらの機能は使用するヘルパーウイルスにより直接付与してもよい。実際に、AAVのrep及びcap領域を含むカセットをヘルパーADEノウイルスに挿入することが可能である。

本発明の方法では、プラスミド（場合によりAAVプラスミドとRepCapプラスミド）のトランスフェクションは当業者に公知の任意の方法により実施することができる。但し、トランスフェクション効率が良好であるほど産生レベルを改善することができる。この点で、出願人は産生細胞にプラスミドをトランスフェクトするために特に有効な方法を今般開発した。

この方法はポリカチオン脂質と核酸集密化剤を使用する方法である。この方法の利点の1つは、細胞の形態又は物理的状態を変えないと思われる点にもある。リポフェクタミン、トランスフェクタム等の種々のカチオン脂質を使用することができる。有利なDNA集密化剤としては、ヒストン、ヌクレオリン等の核タンパク質から誘導されるペプチドを挙げることができる。

種々のプラスミド及びヘルパーウイルスを産生細胞に同時に導入してもよいし、別々に導入してもよい。別々に導入する場合には、種々の成分の導入順序は高力価を得るために重要ではないと思われる。実施例に示すように、まず最初に細胞にプラスミドを同時トランスフェクトした後、第2段階で細胞にヘルパーウイルスを感染させると、高力価が得られた。

本発明の1特定態様は、ADEノウイルスのE1及びE4機能をトランス相補する培養細胞に、AAVのITRを両端にもつ着目核酸をもつAAVプラスミドと、AAVのrep及びcap領域をもつプラスミドをポリカチオン脂質と集密化剤の存在下で同時トランスフェクトし、E1及びE4領域を欠損するAd2又はAd5に由来するヒトADEノウイルスとCAV2に由来するイヌADEノウイルスとから選択されるヘルパーADE

ノウイルスを前記培養物に同時感染させ、その後、產生されたウイルスを回収することを特徴とする、組換えAAVの製造方法である。

この態様では、高力価のウイルスと医薬品質のストックが得られる。

本発明は更に、本発明の方法により得られる精製ウイルス（アデノウイルス及びAAV）調製物と、この方法により製造される1種以上の組換え欠損アデノウイルス又はAAVを含む医薬組成物にも関する。本発明の医薬組成物は局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮等の経路で投与するよう調合することができる。

好ましくは、医薬組成物は注射用調合物に医薬的に許容可能なキャリヤーを含有する。キャリヤーとしては、特に滅菌等張塩類溶液（リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等、又はこれらの塩の混合物）、又は場合に応じて滅菌水もしくは生理的食塩水を加えると注射可能な溶液を構成できる乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物が挙げられる。例えばヒドロゲル等の他のキャリヤーも利用できる。このヒドロゲルは生体適合

性で非細胞毒性の任意の（ホモ又はヘテロ）ポリマーから調製できる。このようなポリマーは例えば国際公開第WO 93/08845号に記載されている。特にエチレンオキシド及び／又はプロピレンオキシドから得られるようなポリマーは市販されている。注射に使用するウイルスの用量は種々のパラメーター、特に使用する投与経路、該当疾病、発現させようとする遺伝子、又は所望の治療期間に応じて適応できる。一般に、本発明による組換えアデノウイルスは $10^4 \sim 10^1$ <sup>4</sup><sub>1</sub> p.f.u、好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ <sup>6</sup><sub>10</sub> p.f.u及びAAV粒子 $10^6 \sim 10^{11}$ <sup>6</sup><sub>11</sub> 個の用量で調合及び投与される。p.f.u（「plaques forming units」）なる用語はアデノウイルス溶液の感染能に対応し、適當な培養細胞の感染により測定され、一般に15日後の感染細胞のplaques数を表す。ウイルス溶液のp.f.u力価の測定方法は文献に詳細に記載されている。

治療遺伝子に応じて、こうして製造したウイルスを遺伝病（ジストロフィー、囊胞性線維症等）、神經変性病（アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS等

)、癌、凝血障害又はリポタンパク異常血症に結び付けられる疾病、ウイルス感染に結び付けられる疾病（肝炎、AIDS等）等を含む多数の疾病的

治療又は予防に使用することができる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は単なる例示であってこれによって発明を制限するものではない。

#### 図面の説明

図1：アデノウイルスAd5の遺伝子構成。Ad5の完全配列はデータベースから入手でき、当業者は任意の制限部位を選択又は生成し、こうしてゲノムの全領域を単離することができる。

図2：E4領域の遺伝子構成。

図3：野生型アデノウイルス及びE4欠損アデノウイルスにおけるE4領域の遺伝子構成。欠失の寸法を太線で示す。

図4：(A) カセットMMTV-LTR／(ORF6+ORF7)の模式図。增幅又はRT-PCRに使用したオリゴ1、2及び3の位置を示す。+1=転写開始部位。AAA=ポリアデニル化部位。(B) RT-PCRにより得られる産物の構造。SD=5'ドナースプライシング部位。SA=3'アクセプタースプライシング部位。

図5：ウイルス纖維状物に対するポリクローナル血清を用い

た免疫学的検出によるアデノウイルス纖維状物の產生の分析(Boulangerら)。細胞抽出物はウイルス感染から72時間後に調製し、ウイルスと同時にデキサメタゾンを加える(最終濃度600nM)。(A)ウイルスd11014感染(MOI=10)。(B)ウイルスd11001感染(MOI=1)。(C)ウイルスd11004感染(MOI=10)。(wt)ウイルスAd5感染(MOI=10)。

図6：クローン#2の細胞におけるE4の誘導性。非感染細胞(0未満の対照)又はウイルスd11007を感染させた細胞の抽出物を感染から72時間後に分析した。DM=デキサメタゾン(600nM)。

図7：ウイルス $\Delta E 1$ ,  $\Delta E 4$ のクローン構築ストラテジー。

#### 一般分子生物学技術

プラスミドDNAの分取抽出、プラスミドDNAの塩化セシウム勾配遠心分離、アガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動、DNAフラグメントの電気溶離精製、タンパク質のフェノール又はフェノールークロロホルム抽出、塩類溶媒中のDNAのエタノール又はイソプロパノール沈降、大腸菌での形質転換等の分子生物学で慣用的に使用されている方法は当業者に周知

であり、文献に詳細に記載されている [Maniatis T. ら, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M. ら(編), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]。

pBR322、pUC型のプラスミド及びM13系ファージは市販されている (Bethesda Research Laboratories)。連結のためには、DNAのフラグメントをアガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動によりその寸法に応じて分離し、フェノール又はフェノール／クロロホルム混合物で抽出し、エタノール沈降させた後、製造業者の指示に従ってファージT4 DNAリガーゼ (Biolabs) の存在下でインキュベートすればよい。付着5'末端の充填は製造業者の指示に従って大腸菌のDNAポリメラーゼIのクレノーフラグメント (Biolabs) により実施することができる。付着3'末端の破壊は、ファージT4 DNAポリメラーゼ (Biolabs) を製造業者の指示に従って使用することにより実施される。付着5'末端の破壊はS1ヌクレアーゼ処理により実施される。

合成オリゴヌクレオチドによるインビトロ突然変異誘発は、Amershamから市販されているキットを使用することにより、Taylorら [Nucleic

i c A c i d s R e s. 13 (1985) 8749~8764]により開発された方法に従って実施することができる。所謂PCR法 [P o l y m e r a s e-c a t a l y z e d C h a i n R e a c t i o n, Saiki R. K. ら, S c i e n c e 230 (1985) 1350~1354; Mullis K. B. とFaloona F. A., M e t h. E n z y m. 155 (1987) 335~350]によるDNAフラグメントの酵素増幅は、「DNAサーマルサイクラー」(Perkin Elmer Cetus)を製造業者の指示に従って使用することにより実施することができる。ヌクレオチド配列の確認は、A m e r s h a mにより市販されているキットを使用することにより、Sangerら [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 (1977) 5463~5467]により開発された方法により実施することができる。

実施例1：プロモーターの制御下におけるE4領域の種々の機能ユニットをもつプラスミドの構築

#### 1. 1. プラスミドp E 4 G e nの構築

プラスミドp PY2はd a m 大腸菌コンテクストから作製したプラスミドp I C 2 O HのX b a 1及びS a l 1部位間にプラスミドp M S G (Pharmacia)のA v r II-S a l I フラグメント (MMTVのプロモーターを含む約1.3 k b) をクローニングしたものに対応する。プラスミドp PY4はB a m H I及びB g I I Iで切断後に35 b pのフラグメントを欠失させてから再連結することによりプラスミドp PY2から得られる。プラスミドp PY5は35576 (T a q I) 及び32490位 (B g I I I) 間に位置する5型のアデノウイルスのE4領域を含むT a q I-B g I I Iフラグメントをプラスミドp I C 2 O HのC l a I及びB a m H I部位間にクローニングしたものに対応する。従って、プラスミドp PY5のE4領域はプラスミドp PY4のS m a I及びS p h I部位間を部分消化後にクローニング可能なE c o R V-S p h I フラグメントに含まれ、こうしてプラスミドp PY6が生成される。293細胞にゲネチシン耐性を付与する遺伝子をもつプラスミ

ド p K I X X (Pharmacia) の X h o I フラグメントをプラスミド p P Y 6 に挿入すると、プラスミド p O R F 6 G e n が生成される。従って、このプラスミドは選択可能遺伝子と、MMTVプロモーターから発現されるアデノウイルス E 4 領域の全部をもつ。この特定プラスミドにおいてこれらの 2 つの遺伝子は連続しており、夫々のコーディング配列は同一の DNA 鎖に含まれる。従って、このプラスミドでは読み取り枠 O R F 1 の上流 (35548 位付近) に位置する主要 5' ドナースプライシング部位は保存されて、適正な代替スプライシングを付与し、ウイルスサイクル中に観察される代替スプライシングと同様に、E 4 領域の全コーディング枠の種々の発現産物を生成することができる。

### 1. 2 プラスミド p O R F 6 G e n の構築

プラスミド p P Y 1 3 はプラスミド p I C 2 0 H の対応部位間にプラスミド p P Y 6 の B g I I I - X b a I フラグメントをクローニングしたものに対応する。従って、1. 6 k b のこのフラグメントは 34115 位 (B g I I I ) ~ 324.9 0 位 (B g I I I 、プラスミド p I C 2 0 H の多クローニング部位に由来する X b a I 部位がこれに続く) の 5 型アデノウイルスの配列

を含む。従って、プラスミド p P Y 1 3 は、このとき X h o I - S p h I フラグメントに含まれるアデノウイルスの読み取り枠 O R F 6 及び O R F 7 の全体を含む。プラスミド p P Y 4 の S a l I 及び S p h I 部位間にこのフラグメントをクローニングすると、プラスミド p P Y 1 5 が生成される。293 細胞にゲネチシン耐性を付与する遺伝子をもつプラスミド p K I X X の X h o I フラグメントをプラスミド p P Y 1 5 に挿入すると、プラスミド p O R F 6 G e n が生成される。従って、このプラスミドは選択可能遺伝子と、MMTVプロモーターから発現されるアデノウイルス E 4 領域の読み取り枠 O R F 6 及び O R F 7 をもつ。この特定プラスミドにおいてこれらの 2 つの遺伝子は連続しており、夫々のコーディング配列は同一の DNA 鎖に含まれる。第 1 の翻訳開始コドンは読み取り枠 O R F 6 のコドン (A d 5 のゲノムでは 34077 位) であり、MMTVプロモーターの C A P 部位から 235 ヌクレオチド離れている。代替スプライシングは逐次的であると共に、はじめに 5' ドナー部位の認識を含むので、読み取り枠 O R F 1 の上流

(35548位付近)に位置する主要5'ドナー部位は、読み取り枠ORF6及びORF6/7の産物の有効な発現を後で可能にするためにプラスマミドpORF6Genの構築に含まれなかった(図4A)。

### 1. 3. プラスマミドpORF4Genの構築

プラスマミドpPY14はプラスマミドpIC20Hの対応部位間にプラスマミドpPY6の(酵素BglIIによる部分消化後に得られる)1.9kbのBglII-XbaIフラグメントをクローニングしたものに対応する。従って、この1.9kbのフラグメントは、34387位(BglII)～32490位(BglII、プラスマミドpIC20Hの多クローニング部位に由来するXbaI部位がこれに続く)の5型アデノウイルスの配列を含む。従って、プラスマミドpPY14は読み取り枠ORF4のほぼ全体に対応するフラグメントBglIIを更に含む以外はプラスマミドpPY13と同一遺伝子である。従って、このプラスマミドは、このときXhoI-SphIフラグメントに含まれるアデノウイルスの読み取り枠ORF4、ORF6及びORF7の全部を含む。プラスマミドpPY4のSalI及びSphI部位間にこのフラグメントをクローニングすると、プラスマミドpPY16が生成される。293細胞にゲネチシン耐性を付与する遺伝子をもつプラスマミドKIXXのXhoIフラグメントをプラスマミドpPY16に挿入するとプラスマミドpORF4Gen

nが生成される。従って、このプラスマミドは選択可能遺伝子と、MMTVプロモーターから発現されるアデノウイルスのE4領域の読み取り枠ORF4、ORF6及びORF7をもつ。この特定プラスマミドにおいてこれらの2つの遺伝子は連続しており、夫々のコーディング配列は同一のDNA鎖に含まれる。プラスマミドpORF6Genの場合と同様に、読み取り枠ORF1の上流(35548位付近)に位置する主要5'ドナー部位は、読み取り枠ORF4、ORF6及びORF6/7の産物の有効な発現を後で可能にするためにプラスマミドpORF4Genの構築に含まれなかった。

### 1. 4. プラスマミドpJY1及びpJY2の構築

本実施例はMMTV由来のプロモーターの制御下にE4の機能ユニット（実施例1、2参照）を含むプラスミドの構築に関する。より詳細には、このプロモーターは5個のグルココルチコイド応答要素を含むMMTVの誘導体、即ちグルココルチコイドにより高度に誘導可能な誘導体である。このプラスミドは次のように構築した。

Ad5のBglIIフラグメント（34115～32490位）はE4領域の配列（ORF6+ORF7）を含む。このフ

ラグメントをまずプラスミドpIC20H（Marshら, Gene 32 (1984) 481）のBglII及びBamHI部位間にクローニングし、ORF6の上流に位置するBglII部位が保存されたプラスミドpPY13を生成した。従って、プラスミドpPY13のBglII-SalIフラグメントはAd5のE4領域の配列（ORF6+ORF7）の全体を含む。このフラグメントをプラスミドpIC20HのBamHI及びSalI部位間にクローニングし、プラスミドpPY45を生成した。

プラスミドpGRE5-1（MaderとWhite, PNAS 90 (1993) 5603）のXbaIフラグメント（約1kb）はグルココルチコイドにより高度に誘導可能なMMTV由来のプロモーターに対応する。このフラグメントを単離し、damコンテクストから単離したプラスミドpIC20Hの2つのXbaI部位間にクローニングした。得られたプラスミドをpPY21と命名した。このプラスミドでは、プラスミドpIC20Hの多クローニング部位に由来するBglII部位は、核レセプターをグルココルチコイドに結合することが可能な5個のプロモーター要素のすぐ上流に位置する。その

後、グルココルチコイドにより高度に誘導可能なプロモーターを含む、プラスミドpPY21のBglII-EcoRIフラグメントをプラスミドpIC20HのBglII及びEcoRI部位間にクローニングし、プラスミドpPY26を生成した。

プラスミドpPY26の対応部位間にプラスミドpPY45のEcoRI-S

p h I フラグメントをクローニングすると、グルココルチコイドにより高度に誘導可能なプロモーターの制御下に A d 5 の配列 (O R F 6 + O R F 7) を含むプラスミド p J Y 1 が生成される (カセット p G R E 5 / (O R F 6 + O R F 7))。

ゲネチシン耐性遺伝子を含む p J Y 1 の誘導体も構築した。プラスミド p M S C V の X h o I - S a l I フラグメントは、細胞で強力なユビキチンプロモーター (P G K) から発現されて真核細胞にゲネチシン耐性を付与する細菌遺伝子 (A P H) を含む。このフラグメントをプラスミド p J Y 1 の S a l I 部位にクローニングした。得られたプラスミドを p J Y 2 と命名した。このプラスミドは同一方向に転写される発現カセット p G R E 5 / (O R F 6 + O R F 7) 及び P G K / A P H を含む。

### 1. 5. プラスミド p G G O の構築

鋳型としてのプラスミド p S G 5 H G R と配列番号 5 :

5'-GGCCCCGCCGCCACCATGGATATTGAACCTGAAGTGTATATGCAGGA-3';

(S m a I 部位はイタリックで示し、翻訳開始 K o z a k コンセンサス配列は太字で示し、G C R の残基 5 3 9 を表すコドンは下線で示す) 及び配列番号 6 :

5'-CTCGAGAACGCCGGACGTAGTCTTTGATGAAACAGAAG-3'

(X h o I 部位はイタリックで示し、T t h IIII 部位は太字で示し、G C R の残基 7 7 7 を表すコドンは下線で示す) のデオキシリゴヌクレオチドを使用して P C R 増幅後に A d 5 の E 4 領域の G C R (H B D) 及び O R F 6 + O R F 7 部分を結合する。配列番号 5 のオリゴヌクレオチドは G C R のアミノ酸 5 3 9 ~ 7 7 7 に相当する G C R の H B D ドメインの上流に翻訳開始を指定する A T G を配置することができる。配列番号 6 のオリゴヌクレオチドは H B D の下流に制限部位 T t h IIII を配置することができる。まず最初に P C R 増幅フラグメントを市販プラスミド p C R I I にクローニングし、白青スクリーニ

ングによりクローンを選択し、配列決定により同定した（プラスミド p C R I I / G C R）。従って、このプラスミドは配列番号 5 及び配列番号 6 のオリゴヌクレオチドによる P C R 増幅を受けた G C R の H B D ドメインをもつ S m a I - X h o I フラグメントの源である。

プラスミド p M E L 3 は、「ポリリンカー」上の N r u I 部位のすぐ近傍に位置する H i n d I I I 部位を大腸菌のポリメラーゼ I のクレノーフラグメントで処理した後に自己連結して H i n d I I I 部位を N h e I 部位に変換したプラスミド p I C 2 0 H 誘導体の E c o R I 及び P s t I 部位間に挿入されたプラスミド p S L I I 8 0 の E c o R I - P s t I 「ポリリンカー」を含む中間構築物である。プラスミド p M E L 3 は更に、p I C 2 0 H の「ポリリンカー」の B g I I I 部位に予め挿入された S V 4 0 のポリアデニル化シグナルに対応する B a m H I フラグメントも含む。その後、G C R の H B D ドメインを含むプラスミド p C R I I / G C R の S m a I - X h o I フラグメントをプラスミド p M E L 3 の対応部位間に挿入し、プラスミド p M E L 3 / G C R を生成した。

プラスミド p P Y 1 3 を H i n c I I で完全消化し、S s p I

で部分消化してからプラスミドを自己連結後に、そのポリアデニル化部位を含む A d 5 の E 4 領域の配列 O R F 6 + O R F 7 の全体を含む約 1. 4 k b の H i n d I I I フラグメントを含むプラスミド p P Y 1 3 ( $\Delta$  H i n c I I - S s p I) が生成される。

プラスミド p P Y 1 3 ( $\Delta$  H i n c I I - S s p I) を H i n d I I I で消化し、その末端をクレノーポリメラーゼにより充填した。このプラスミドを次に X h o I で消化し、次いで配列 O R F 6 + O R F 7 (約 1. 4 k b) をプラスミド p M E L 3 / G C R の X h o I 及び N r u I 部位間にクローニングし、プラスミド p M E L 3 / G C R - T t h I I I I - (O R F 6 + O R F 7) を生成した。

配列番号 6 のオリゴヌクレオチドにより導入した T t h I I I I 部位を A d 5 配列上の O R F 6 の翻訳 A T G のすぐ下流 (3 4 0 7 0 位) に位置する T t h I I I I 部位と結合すると、G C R の H B D ドメインとタンパク質 O R F 6 との翻訳結合を行うことができる。従って、プラスミド p M E L 3 / G C R - T t h I I I I - (O

R F 6 + O R F 7) を T t h I I I I で消化した後に自己連結し、プラスミド p M E L 3 / G C R - (O R F 6 + O R F 7) を生成する。この構築物を配列決定し、G C R の

H B D ドメインと O R F 6 間の翻訳結合を確実にした。得られたキメラ遺伝子の配列を配列番号 7 に示す。生成タンパク質 G C R - O R F 6 の配列は配列番号 8 に示す。

プラスミド p P Y 2 6 を E c o R I 及び大腸菌のポリメラーゼ I のクレノーフラグメント、次いで B g I I I で処理すると、誘導型プロモーター G R E 5 を含むフラグメントが生成され、これをプラスミド p M E L 3 / G C R - (O R F 6 + O R F 7) のクレノーフラグメントで処理した A p a I 部位と B a m H I 部位の間にクローニングすると、プラスミド p M E L 3 / G R E - (G C R - O R F 6 + O R F 7) が生成される。このプラスミドは G R E 5 プロモーターから発現される融合体 G C R - (O R F 6 + O R F 7) をコードする発現カセットに対応する B g I I I - N h e I フラグメントの源であり、プラスミド p C I - N e o (P r o m e g a) の B g I I I 及び X b a I 部位間にクローニングするとプラスミド p G G O が生成される。

#### 実施例 2：細胞系の構築

本実施例は本発明によるアデノウイルスの E 1 及び E 4 領域に相補的な細胞系の構築に関する。これらの細胞系はヘルパーウイルスを介さずにこれらの領域を欠失する組換えアデノウイ

ルスの構築及び増殖を可能にする。

本発明の細胞系はリン酸カルシウムの存在下で実施例 1 に記載したプラスミドとグルココルチコイドレセプターをコードする構築物を選択細胞に同時トランスフェクトすることにより構築した (H o l l e n b e r g ら, N a t u r e, 318, (1985) 635~641)。より詳細には、G r a h a m と V a n d e r E b (V i r o l o g y 52 (1973) 456) に記載のプロトコールに従い、293 系細胞を直径 5 cm の皿に入れ、プラスミド E 4 (p E 4 G

e n、p O R F 6 G e n、p O R F 4 G e n、p G G 0 又は p J Y 2) 1~5 μ g と場合により S V 4 0 ウイルスの初期プロモーターから発現されるヒトグルココルチコイドレセプターの発現用プラスミド（プラスミド p S G 5 H G R）5 μ g をリン酸カルシウムの存在下でトランスフェクトした。

### 2. 1. ゲネチシン耐性クローニングの選択

細胞のトランスフェクション後にこれらの細胞を洗浄し、次いでウシ胎児血清（最終7%）を補充した培地（M E M, S i g m a）を加えて細胞を20時間インキュベートさせる。翌日、350 mg/l の有効濃度のゲネチシンの存在下で細胞を選択

する。ゲネチシンを3日置きに交換すると、約3週間後に選択可能なクローニングが現れる。トランスフェクトしなかった全細胞が死滅すると、耐性遺伝子を挿入した細胞のみが生き残り、分裂して細胞クローニングを生成する。細胞クローニングが肉眼で見えるように十分に大きい場合には「24ウェル」培養プレートの培養ウェルに夫々移す。次に各クローニングをまず「12ウェル」、次いで「6ウェル」培養プレートのウェルでゲネチシンの存在下に漸次増幅した後、細胞培養皿で増幅する。その後、各細胞クローニングを液体窒素中で凍結保存する。

### 2. 2. E 4欠損ウイルスを産生することが可能なクローニングの選択

アデノウイルス A d 2 d 1 8 0 8 (Weinberg と Ketner, J. Virol. 57 (1986) 833)、A d 5 d 1 1 0 0 4、d 1 1 0 0 7 又は d 1 1 0 1 4 (Bridge と Ketner, J. Virol. 63 (1989) 631)、d 1 1 0 1 1 (Bridgeら, J. Virology 193 (1993) 794) は E 4 領域のレベルに重大な缺失をもつ缺失突然変異体である。これらの突然変異体は 293 細胞で複製することができないが、W 1 6 2 細胞で產生させるこ

とはできる (Weinberg と Ketner, PNAS 80 (1983) 5383)。第2段階では、50個のゲネチシン耐性クローニングを試験し、これらの E 4 ウィルスを产生し、従って E 4 領域をトランス相補する能力を調べた。ブ

ラスミド p J Y 2 をトランスフェクトした 60 個のゲネチシン耐性クローンも、E 4 領域をトランス相補するこの能力についてスクリーニングした。

このために、約 0.1 P F U / 細胞の感染多密度をもつウイルス d 1808 を液体培地中で各クローンに感染させる（ウイルス力価は W 162 細胞系で得る）。感染はデキサメタゾン ( $1 \mu M$ ) を補充した培地でクローン p J Y 2 細胞 1 個当たり 0.5 p f u の感染多密度で実施した。得られた細胞溶解物を細胞に連続再感染させて増幅可能な細胞変性作用が出現したならば、着目クローンの細胞で d 1808 がある程度ウイルス増殖したと判断される。その後、このトランス相補を d 1808 感染後のウイルス複製度と細胞のウイルスpla-que能の分析により判定する（可能なプロトコールは H i t t , M. ; B e t t , A. J. ; P r e v e c , L. と G r a h a m , F. L. "Construction and propagation

ion of human adenovirus vectors" in: Cell Biology; a Laboratory Handbook. Volume 1. J. E. Celis (編); Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p 479~490 に記載されている）。

この段階により、E 4 領域の有効なトランス相補性を示す数個の特定のクローンを明らかにすることことができた。第 1 のクローンはクローン # 2 であり、プラスミド p O R F 6 G e n のトランスフェクションにより得られ、第 2 のクローンはクローン # 4 であり、プラスミド p E 4 G e n のトランスフェクション後に単離されたものである。E 4 領域をトランス相補することができ且つグルココルチコイドにより高度に誘導可能な安定なクローンも、プラスミド p J Y 2 を 293 細胞にトランスフェクション後に得られた。更に、E 4 領域を欠損するウイルスを有効に増殖することができ且つ非ステロイド化合物により高度に誘導可能な他の安定なクローンも作製した。これらのクローンは、ハイブリッドレセプターが R U 486 の存在下では G R E 5 プロモーターをトランス活性化することができるが、ステ

ロイドの存在下ではできないように、トランス作用領域（V P 1 6）と、グルココルチコイドレセプター由来のD N Aを結合する領域と、プログステロンレセプターのC末端截頭部分とから構成される人工トランス作用因子を発現するプラスミドとプラスミド p J Y 2とを293細胞に同時トランスフェクトすることにより得られた。得られたクローンはR U 4 8 6の存在下でE 4欠損ウイルスを有効に増殖させることができる。

p G G 0 プラスミド単独、又はプラスミド p G G 0 及び p S G 5 H G R の等モル組み合わせを2又は5型アデノウイルスの許容細胞にトランスフェクトし、400mg／lのゲネチシンの存在下で安定なクローンを選択する。例えば、293細胞にプラスミド p G G 0 をトランスフェクトすると、デキサメタゾン（1μM）の存在下でE 1及びE 4二重欠損ウイルスを増殖させることができるが、添加しないと増殖できないクローン I G R P 1 8 が生成される。

### 2. 3. E 1欠損アデノウイルスの増殖能

作製した細胞系がE 1領域を相補する能力をアデノウイルスA d - R S V β G a l 感染後に確認した。この第1世代のアデノウイルス（E 1のみ欠損）はウイルスR S VのL T Rプロモ

ーターの制御下で大腸菌のL a c Z遺伝子を含む（S t r a t f o r d - P e r r i c a u d e tら, J. C l i n. I n v e s t. 90 (1992) 626）。クローン# 2、# 4の細胞とp J Y 2で得られた細胞にウイルスA d - R S V β G a l を感染させ、各クローンでウイルス増殖を観察した。

これらの結果、細胞がE 1領域をトランス相補する能力はE 4領域の遠位部分（クローン# 2、細胞p J Y 2）又は完全E 4領域（クローン# 4）の付加導入により変化しないことが判明した。

### 2. 4. E 4機能ユニットのゲノム組込みを確認するためのサザン、ノーザンプロット及びR T - P C R分析

クローン# 2及び# 4の細胞をサザンプロットで分析し、ウイルスタンパク質の発現を確認した。より詳細には、M a n i a t i sらにより記載されているプロトコールに従ってサザンプロット分析（アデノウイルスE 4領域に由来する放

放射性プローブとハイブリダイズするゲノムDNAの分析)を実施した。このために、293細胞及び#2のゲノムDNAを調製した。Taqポリメラーゼ、配列番号1のオリゴヌクレオチド1(MMTVプロモーターのヌクレオチド52~71に対応)及び配

列番号2のオリゴヌクレオチド2(Ad5のゲノムの32921~32940位に対応)の存在下で実施したPCR反応でこのDNA $2\mu g$ を鋳型として使用した。これらのオリゴヌクレオチドはプラスミドpORF6Genの2617bpのフラグメントを増幅する。増幅は、94°Cで5分間変性と、94°Cで1分間変性、60°Cで2分間ハイブリダイゼーション及び70°Cで3分間伸長による増幅30サイクルと、最終サイクル時の10分間延長した伸長とからなる条件下で実施した。その後、増幅産物をSDS 1%アガロースゲル電気泳動により分析し、サザンプロット及びアデノウイルスの(O RF6+ORF7)領域又はMMTV領域をカバーする標識プローブとのハイブリダイゼーションにより同定した。

ノーザンプロット及びRT-PCR分析(アデノウイルスE4領域に由来する放射性プローブとハイブリダイズするクローン2及び4の細胞RNAの分析)はManiatisらにより記載されているプロトコールに従って実施し、ポリアデニル化細胞DNAはR. E. Farrell Jr. "RNA isolation strategies". in: RNA Methodologies; a Laboratory

Guide for Isolation and Characterization. Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p46~92)に記載のプロトコールに従って調製した。RT-PCRでは、ポリA<sup>+</sup>RNA 500ngをDNase I 0.5単位で処理した後、オリゴ(dT)プライマーで逆転写させた。こうして得られた1本鎖cDNA調製物の10分の1を鋳型として使用し、MMTVプロモーターのcap部位に対して227~246位ヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチド2(配列番号2)及びオリゴヌクレオチド3(配列番号3)によりPCR反応を実施し

た。これらのオリゴヌクレオチドは、スプライシングなしのORF6 mRNAの1255 bpのフラグメントと、スプライシングされたORF6/7 mRNAの545 bpのフラグメントを増幅するために構築した。増幅産物を SDS 1%アガロースゲルで分析し、サザンプロットと標識プローブ (ORF6+ORF7)とのハイブリダイゼーションにより同定した。

これらの分析の結果、これらの2種のクローンは細胞当たり数コピーの割合で組込まれた夫々のE4機能ユニットをもつこ

とを立証することができた。更に、これらの試験の結果、これらの2種のクローンは欠失突然変異体Ad5d11004、Ad5d11011及びAd5d11014による感染後にアデノウイルスの纖維状タンパク質を発現することが判明した(図5)。このタンパク質はアデノウイルスの複製感染サイクルの後期タンパク質であり、その合成にはE4の発現が必要である。E4 突然変異体に感染した細胞にこのタンパク質が存在することは、これらの細胞がE4機能活性を実際発現することを裏付ける。

サザンプロット分析は、クローン#2がそのゲノムに組込まれたカセットMM TV-(ORF6+ORF7)の1コピーを含むことをより具体的に示す。このカセットの完全性は更に、オリゴヌクレオチド1及び2で増幅して2.6 kbの所望フラグメントが生成されることからも立証され(図4)、このような増幅は(ORF6+ORF7)ユニット又はプロモーターMM TVに対応する放射性標識プローブにより特異的に検出できる。本発明の細胞に適正な代替スプライシングが存在することはRT-PCRによっても立証された。即ち、デキサメタゾンの存在下(誘導条件)で培養した非感染クローン#2で放射性

標識プローブ(ORF6+ORF7)により2個の主シグナルが特異的に検出された。大きいほうのシグナルは約1.3 kbのフラグメントであり、ORF6/ORF7から誘導されるスプライシングなしの産物に完全に一致する寸法である。他方のシグナルは約0.6 kbのフラグメントであり、メッセンジャーORF6/7を生成する712ヌクレオチドのイントロンの切出し(スプライシング時

)に一致する寸法である。これらの結果は、本発明の細胞で適正な代替スプライシングが行われ、E 4領域の2種の産物ORF6及びORF6／7がこれらの細胞で実際に発現されることを明白に示す。

更に、本発明の細胞がORF6領域の機能的産物を発現する能力を前記纖維状タンパク質の免疫検出により立証した。その結果、アデノウイルスAd5 d1 1007に感染した293細胞は纖維状物を產生しないことが判明した。他方、この突然変異体による感染後に本発明の細胞（特にクローン#2）では纖維状物に特異的なシグナルが検出され、他の非感染細胞では検出されない。デキサメタゾンの存在下で突然変異体d1808、d11004（ORF1<sup>+</sup>）、d11011又はd11014（ORF4<sup>+</sup>）に感染した本発明の細胞でも纖維状物の存在が立証された。

#### 2. 5. プラーク形成

この分析は本発明による細胞系の特に有利な性質を明白に立証するものである。実際に、2種のクローン（クローン#2及び#4）はE4領域をトランス相補して例えば突然変異体Ad2d1808又はAd5d11004を同等の効率で増殖することができるが、突然変異体Ad2d1808、Ad5d11004、Ad5d11007、Ad5d11011又はAd5d11014に感染後のウイルスプラーク形成に関しては非常に有意差がある。

ウイルスプラーク形成能は産生細胞系に不可欠の性質である。実際にこの条件下で組換えウイルスクローンを単離し、その後、增幅及び精製することができる。得られた結果は、クローン#2では常にウイルスプラーク形成が観察されるが、クローン#4では殆ど生じないことを明白に示す。これらの結果は、E4領域の特定機能ユニットのみを組込んだ本発明の細胞系の非常に優れた性質を明示している。

#### 2. 6. E4活性の調節発現

本発明によるクローン#2の別の有利な性質は、E4活性の

発現の調節誘導特性である。即ち、得られた結果はデキサメタゾンの存在下でし

かウイルスのplaques形成が観察されないことを示す。また、クローン#2では、突然変異体Ad5d11007感染後のアデノウイルスの纖維状タンパク質の発現は誘導条件下で有意に増加する(図6)。突然変異体Ad5d1808、Ad5d11004、Ad5d11011及びAd5d11014でも同一の結果が得られた。他方、クローン#4におけるE4活性の発現は構成的である。

これらの結果をまとめると、E4領域の特定機能ユニットのみを組込んだ本発明の細胞系の利点が明白に立証される。これらの利点は特に、液体培地中でウイルスplaquesを形成して欠損ウイルスの増幅を可能にできる点にある。これらの利点は、より多量のE4の機能ユニットが存在する細胞系とは対照的に、E4活性の発現を調節できる特性にもある。

#### 実施例3：E1及びE4機能欠損ウイルスの製造

本実施例はE1及びE4領域を欠損する組換えウイルスの製造のための本発明による細胞系の使用に関する。これらのアデノウイルスは、(E1領域に欠失をもつ)組換えウイルスのゲノムの左側部分を付与するDNAフラグメントと、(E4領域

に欠失をもつ)組換えウイルスのゲノムの右側部分を付与するDNAフラグメントとの2つのDNAフラグメントを本発明の細胞に同時トランスフェクション後に相同組換えすることにより製造した。

より詳細には、293E4細胞(クローン#2及び#4)にSrfIで消化したウイルスAd-RSV $\beta$ Gal(Stratford-Perricaudetら)のDNA10mg(又はこのウイルスの構築に使用し、XmnIで消化したプラスミドのDNA5mg)と、酵素C1aIで消化したE4領域の機能欠失を付与するウイルス(例えばAd2d1808、Ad5d11004、Ad5d11007又はAd5d11014)のDNA10mgを同時トランスフェクトした。細胞変性作用の出現後、少なくとも2回の連続サイクルにより、クローン2でplaquesを形成させる為に固体培地にプレーティングして、ウイルスを精製した。次に、所望のウイルスの感染に対応するplaques(E1及びE4二重欠失を立証するDNAの分析)を連続感染サイクルにより増幅する。塩化セシウム勾

配精製により高力価のストックを調製する。ウイルスを当業者の慣用技術により  
-80°Cで保存する。

クローン2はウイルスpla克形成能に加え、ウイルスd11014から構築されるウイルスAD5d11014(E1'E4'且つORF4')又はE1'E4'ウイルスに特に有効な液体培地中での増殖が可能である。

他方、プラスミドpE4Genのトランスフェクション後に得られるクローン4は、(所望の組換えウイルスがβ-ガラクトシダーゼをコードしない場合には殊更に)ウイルス溶解pla克を容易に同定できるように十分長時間細胞集密を維持しにくいので、pla克形成能はあまり高くない。

別の製造方法は、本発明によるウイルスのクローニング構築である。より詳細には、この方法によると、ウイルスのゲノムの一部を各々付与する3個のオーバーラップするDNAフラグメントの同時トランスフェクション後にインビボでの二重の相同組換えによりアデノウイルスΔE1ΔE4を產生させる。

より詳細には、ゲノムAdRSVβgal及びAdd11014から誘導される次の3個のオーバーラップするフラグメントを電気溶離により精製した(図7)。

i) フラグメントI: このフラグメントはAdRSVβgalのゲノムの左側部分(ΔE1)に対応するβgalをコード

する6.8kbのNarIフラグメントである。NarIで完全に消化すると、26ヌクレオチドから3.8kbまでの25個の他のフラグメントのうちでこのフラグメントが生成されるので、非切断(従って複製型)AdRSVβgalゲノムによる汚染は殆ど不可能である。

ii) フラグメントII: このフラグメントは同様にAdRSVβgalのゲノムから誘導される9.4kbのDraIフラグメントであり、1509ヌクレオチドがフラグメントIとオーバーラップする(図7参照)。このフラグメントはDraI及びAf1IIで完全消化後に494ヌクレオチド~4.8kbの寸法の10個の付加フラグメントから精製されているので、このフラグメントも感

染性ゲノムにより汚染されることは不可能である。

i i i) フラグメント III : このフラグメントは Ad5d11014 のゲノムから誘導される 21.3 kb の NsiI フラグメントである。これは 1652 フラグメントがフラグメント II とオーバーラップする (図 7)。このフラグメントは改変 E4 領域 ( $\Delta E4$ ,  $ORF4^+$ ) を含む組換えウイルスのゲノムの右側部分を付与する。このフラグメントは NsiI で

完全消化して 178 ネクレオチド～4 kb の寸法の 7 個のフラグメントを生成後に精製されているので、このフラグメントも汚染は不可能である。

293 細胞について記載したプロトコールに従い、溶媒中  $1 \mu M$  デキサメタゾンの存在下 (4 日毎に 3 週間添加) でクローン #2 細胞に精製フラグメントを同時にトランスフェクトした。この培養後に細胞を回収し、氷／エタノール浴で 3 回凍結融解させた後、3000 g で 20 分間遠心分離した。次に細胞溶解物をデキサメタゾン ( $1 \mu M$ ) の存在下でクローン #2 細胞 (IGRP2 とも呼ぶ) の新鮮な培養物に加えた。5 日後に細胞変性作用が観察され、ウイルスの產生が立証された。 $1 \mu M$  デキサメタゾンの存在下で亜集密クローン #2 細胞を含む  $10 cm^3$  100 個で細胞変性作用を誘導する混合物の漸次増幅後にこの組換えウイルス Ad $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ ,  $ORF4^+$  のストックが得られた。塩化セシウム勾配分離及び  $4^\circ C$  で透析後、X-Gal でインビトロ染色前にデキサメタゾン ( $1 \mu M$ ) を補充したクローン #2 細胞の単層でウイルスストックを滴定した。全プランクが陽性であるならば、pfu/m<sup>10</sup> 即ち  $\beta$ -gal を発現するウイルスプランクとして力値を表すことができる。

この方法により、 $10^{10}$  pfu のストックを調製した。次に、このストックに RCA が存在しないことを制限分析及びサザン分析により確認した。このために、Challberg (Virology 114 (1981) 196) の方法に従ってストックの組換え体のウイルス DNA を調製した。この DNA  $2 \mu g$  を制限分析及び 1% アガロースゲル分析にかけた。フラグメントを Hybond-N 膜 (Amersham) に移し、ウイルスゲノムの末端に位置するフラグメント

を特異的に検出するためにアデノウイルスのITRに対応する放射性プローブとハイブリダイズさせた。

Sma I、Af I II 又は S t u I による制限分析は、種々の制限フラグメントの相対的化学量論量から明らかのように、E 1<sup>+</sup> 又は E 4<sup>+</sup> フラグメントにより汚染されていない調製物で所望のプロファイルを与えた。

膜に移した後のサザン分析の結果、S t u I による消化は ITR プローブとハイブリダイズする 2 つのフラグメントしか生成しないことがわかり、これらのフラグメントの一方は  $\beta$  g a l をコードする A d R S V  $\beta$  g a l の 1125 b p のフラグメントの移動度に対応する移動度を示し、他方は、E 4 欠失をも

つ A d 5 d 1 1 0 1 4 の 2673 b p の S t u I フラグメントとして移動する。オートラジオグラムを更に延長して露光してもフラグメント E 1<sup>+</sup> (3158 b p) 又は E 4<sup>+</sup> (3980 b p) に対応する寸法をもつ付加バンドは全く現れない。また、組換え体のゲノムに E 4 機能ユニット (ORF 4 + ORF 6 + ORF 7) を導入した寸法 (3267 b p) に対応するフラグメントも検出されず、産生中にウイルスゲノムと細胞に組込まれた E 4 ユニットの間で二重組換えは行われなかったことを示した。従って、これらの結果は RCA を含まないウイルス  $\Delta$  E 1,  $\Delta$  E 4 のロットを有效地に製造するために本発明の細胞を使用できることを立証する。

#### 実施例 4：組換えAAVの製造

本実施例は AAV の製造のための、アデノウイルスゲノムの E 4 領域の全部又は一部を含む細胞系の使用に関する。これらの AAV は AAV-ITR プラスミドと R e p / C a p プラスミドを前記細胞系に同時トランスフェクトし、ヘルペアデノウイルスを同時感染させることにより產生させた。

#### 使用したプラスミド及びウイルス

- pMA10 と呼ぶ AAV-ITR プラスミド：このプラス

ミドは AAV の 2 ITR に挟まれた着目核酸 (RVS-LTR プロモーター、核局在シグナルに先行される L a c Z 遺伝子、及び SV40 ウィルスのポリアデニ

ル化部位から構成される大腸菌の $\beta$ -gal遺伝子の発現カセット)を含む。プラスミドpMA10は、プラスミドpXL2582をSpeIで消化し、T4バクテリオファージDNAリガーゼ処理により連結することにより得られた。この処理はAAVの左側ITRの下流でパリンドローム配列を除去することができる。プラスミドpXL2582は(仏国特許出願第94 02445号に記載されている)pXL2359のEcoRI-KpnI部位に下記フラグメントを連結することにより得られた。

- a) pXL2580のEcoRI-XbaI(AAVの公表配列上のHinfI部位であるヌクレオチド155までのAAVの左側ITRを含む)、及び
- b) pXL2359のXbaI-KpnI(LacZ遺伝子の発現カセットを含む)。

プラスミドpXL2580はpXL2359から以下のように得た。pXL2359をEcoRI-XbaIで消化し、1%アガロースゲルに堆積し、650bpのフラグメントを精製

した。このフラグメントをHinfIで再消化し、T4バクテリオファージDNAポリメラーゼで処理し、PstIで再切断した後、2%アガロースゲルに堆積し、200bpのフラグメントを精製した。ヌクレオチド155までのAAVの左側ITRを含むこのフラグメントをpBKS+(Stratagene)のPstI-SmaI部位間に導入した。

—Rep/Capプラスミド：使用したプラスミドpΔBaIはLebkowskisら(Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 3988)に記載されている。このプラスミドは内在性プロモーターP5の制御下にAAVのrep及びcap領域を含む。P5プロモーターを、特に構成RVS-LTRプロモーター等の他のプロモーターに置換てもよい。

—使用したヘルパーAdenoウイルスは野生型AdenoウイルスAd5である。当然のことながら他のヘルパーウイルスを使用してもよく、特にE1及び/又はE4領域欠損Ad5、又はイヌAdenoウイルスを使用できる。イヌAdenoウイルスを使用する利点は、ヒトで欠損ウイルスでありながらAAVの複製を助長できる

ことである。従って、得られる r A A V 調製物は R C A と汚染性ヒトアデノウイルスを全く含まない。

### プロトコール

予め M E M 1 0 % F C S 培地に 2 4 ~ 4 8 時間接種しておいたクローン # 2 ( I G R P 2 ) 細胞を直徑 5 c m の皿 2 0 個に容器 1 個当たり細胞約  $3 \times 10^6$  個の密度でトランスフェクトすることにより製造を行った。各皿に製造業者の指示に従ってペプチド H 1 1 6  $\mu$  g 、リポフェクタミン ( G i b c o - B R L , L i f e T e c h n o l o g i e s ) 1 6 . 5  $\mu$  l 及び O P T I M E M リポフェクタミン ( G i b c o - B R L , L i f e T e c h n o l o g i e s ) の存在下でプラスミド p M A 1 0 1  $\mu$  g とプラスミド p Δ B a l 5  $\mu$  g を同時トランスフェクトした。混合物を細胞に 4 ~ 1 6 時間接触させた後、トランスフェクション混合物を取り出し、最終容量 5 0 0  $\mu$  l 中細胞 1 個当たりウイルス 1 0 p f u の感染度で細胞にヘルパーアデノウイルスを 1 時間感染させた。次に培地 M E M 1 0 % F C S + デキサメタゾン  $10^{-6}$  M を加えた。5 日後に細胞を回収し、緩衝液 T r i s H C l 1 0 mM ( p H 8 ) に取り、3 回凍結融解により溶解させた後、夫々 0 . 2 5 % 及び 1 % の濃度のデオキシコール酸ナトリウム及びトリプシンで 3 7 °C で 3 0 分間処理した。その後、產生された組換え A A V を

3 5 0 0 0 r p m の S W 5 5 , 1 ローターに 2 0 時間入れ、密度 1 . 4 の塩化セシウム勾配部分を精製した。

これらの実験により  $10^{11}$  ゲノム / m l の高力価の組換えウイルスが得られた。従って、この方法はヒトで治療用途に適した品質をもつ非常に多量の組換え A A V を製造することができる（従来技術に記載の方法では 1 0 ~ 1 0 0 分の 1 の力価しか得られない）。更に、1 0 倍超の量の細胞を容易に使用することができ、従って、より高いウイルス力価が得られる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

AAGCAGCCAA GGGCTTGT

20

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ACCCCTAGTAT TCAACCTGCC

20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ATCATCACAA GAGCGGAACG

20

配列番号：4

配列の長さ：3189

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CATCCTCTTA CACTTTTCA TACATTGCCA AAGAATAAAAG AATCGTTGT GTTATGTTTC	60
AACGTGTTTA TTTTTCAATT GCAGAAAATT TCAAGTCATT TTTCATTAG TAGTATAGCC	120
CCACCACCAAC ATAGCTTATA CAGATCACCG TACCTTAATC AAACTCACAG AACCTAGTA	180
TTCAACCTGC CACCTCCCTC CCAACACACA GAGTACACAG TCCTTTCTCC CCGGCTGGCC	240
TTAAAAAGCA TCATATCATG GGTAAACAGAC ATATTCTTAG GTGTTATATT CCACACGGTT	300
TCCTGTCGAG CCAAACGCTC ATCAGTGATA TTAATAAACT CCCCAGGAG CTCACTTAAG	360
TTCATGTCGC TGTCCAGCTG CTGAGCCACA GGCTGCTGTC CAACTGCGG TTGCTTAACG	420
GGCGGCGAAG GAGAAGTCCA CGCCTACATG GGGGTAGAGT CATAATCGTG CATCAGGATA	480
GGGCGGTGGT GCTGCAGCAG CGCGCGAATA AACTGCTGCC GCCGCGCGTC CGTCCTGCAG	540
GAATACAACA TGGCAGTGGT CTCCTCAGCG ATGATTGCA CCGCCCCGAG CATAAGGCAG	600
CTTGTCTCC GGGCACAGCA GCGCACCCCTG ATCTCACTTA AATCAGCACA GTAACGCGAG	660
CACAGCACCA CAATATTGTT CAAAATCCCA CAGTGCAAGG CGCTGTATCC AAAGCTCATG	720
GCGGGGACCA CAGAACCCAC GTGGCCATCA TACCACAAGC GCAGGTAGAT TAAGTGGCGA	780
CCCCCTCATAA ACACGCTGGA CATAAACATT ACCTCTTTG GCATGTTGTA ATTACACCACC	840
TCCCCGTACC ATATAAACCT CTGATTAAAC ATGGCGCCAT CCACACCAC CCTAAACCAG	900
CTGGCCAAAA CCTGCCCGCC GGCTATACAC TGCAGGGAAC CGGGACTGGA ACAATGACAG	960
TGGAGAGCCC AGGACTCGTA ACCATGGATC ATCATGCTCG TCATGATATC AATGTTGGCA	1020
CAACACAGGC ACACGTGCAT ACACCTCCTC AGGATTACAA GCTCCTCCCG CGTTAGAAC	1080
ATATCCCAGG GAACAACCCA TTCCTGAATC AGCGTAAATC CCACACTGCA GGGAAAGACCT	1140
CGCACGTAAC TCACGTTGTG CATTGTAAA GTGTTACATT CGGGCAGCAG CGGATGATCC	1200
TCCAGTATGG TAGCGCGGGT TTCTGTCTCA AAAGGAGGT GACGATCCCT ACTGTACGGA	1260
GTGCGCCGAG ACAACCGAGA TCGTGTGGT CGTAGTGTCA TGCCAAATGG AACGCCGGAC	1320
GTAGTCATAT TTCCCTGAAGC AAAACCAGGT GCGGGCGTGA CAAACAGATC TGCCTCTCCG	1380
GTCTCGCCGC TTAGATCGCT CTGTTAGTA GTTGTAGTAT ATCCACTCTC TCAAAGCATC	1440
CAGGCGCCCC CTGGCTTCGG GTTCTATGTA AACTCCTTCA TGCGCCGCTG CCCTGATAAC	1500
ATCCACCAACC GCAGAATAAG CCACACCCAG CCAACCTACA CATTGTTCT GCGAGTCACA	1560
CACGGGAGGA GCGGGAAAGAG CTGGAAGAAC CATGTTTTT TTTTTATTCC AAAAGATTAT	1620
CCAAAACCTC AAAATGAAGA TCTATTAAGT GAACGGCGTC CCCTCCGGTG GCGTGGTCAA	1680
ACTCTACAGC CAAAGAACAG ATAATGGCAT TTGTAAGATG TTGCACAATG GCTTCCAAAA	1740

GGCAAACGGC CCTCACGTCC AAGTGGACGT AAAGGCTAAA CCCTTCAGGG TGAATCTCCT	1800
CTATAAACAT TCCAGCACCT TCAACCATGC CCAAATAATT CTCATCTCGC CACCTTCTCA	1860
ATATATCTCT AAGCAAATCC CGAATATTAA GTCCGGCCAT TGAAAAATC TGCTCCAGAG	1920
CGCCCTCCAC CTTCAGCCTC AAGCAGCGAA TCATGATTGC AAAAATTCA GTTCCCTACA	1980
GACCTGTATA AGATTCAAAA GCGGAACATT AACAAAAATA CCGCGATCCC GTAGGCCCT	2040
TCGCAGGGCC AGCTGAACAT AATCGTGCAG GTCTGCACGG ACCAGCGCGG CCACTTCCCC	2100
GCCAGGAACC ATGACAAAAG AACCCACACT GATTATGACA CGCATACTCG GAGCTATGCT	2160
AACCAGCGTA GCCCCGATGT AAGCTTGTG CATGGGCGGC GATATAAAAT GCAAGGTGCT	2220
GCTCAAAAAA TCAGGCAAAG CCTCGCGAA AAAAGAAAGC ACATCGTAGT CATGCTCATG	2280
CAGATAAAGG CAGGTAAGCT CCGGAACCAC CACAGAAAAA GACACCATT TTCTCTAAA	2340
CATGTCTGCG GGTTTCTGCA TAAACACAAA ATAAAATAAC AAAAAAACAT TTAAACATTA	2400
GAAGCCTGTC TTACAACAGG AAAAACAAACC CTTATAAGCA TAAGACGGAC TACGCCATG	2460
CCGGCGTGAC CGTAAAAAAA CTGGTCACCG TGATTAAGA GCACCACCGA CAGCTCCTCG	2520
GTCATGTCCG GAGTCATAAT GTAAAGACTCG GTAAACACAT CAGGTTGATT CACATCGGTC	2580
AGTGCTAAA AGCGACCGAA ATAGCCGGG GGAATACATA CCCGCAGGCG TAGAGACAAC	2640
ATTACAGCCC CCATAGGAGG TATAACAAAA TTAATAGGAG AGAAAAACAC ATAAACACCT	2700
GAAAAACCT CCTGCCTAGG CAAAATAGCA CCCTCCCGCT CCAGAACAAAC ATACAGCGCT	2760
TCCACAGCGG CAGCCATAAC AGTCAGCCTT ACCAGTAAA AAGAAAACCT ATTAAAAAAA	2820
CACCACTCGA CACGGCACCA GCTCAATCAG TCACAGTGTA AAAAAGGCC AAGTGCAGAG	2880
CGAGTATATA TAGGACTAAA AAATGACGTA ACGGTTAAAG TCCACAAAAA ACACCCAGAA	2940
AACCGCACGC GAACCTACGC CCAGAAACGA AAGCCAAAAA ACCCACAAC TCCCTCAAATC	3000
GTCACTTCCG TTTTCCCACG TTACGTCACT TCCCATTAA AGAAAACTAC AATTCCAAC	3060
ACATACAAGT TACTCCGCC TAAAACCTAC GTCACCCGCC CCGTTCCAC GCCCGCGCC	3120
ACGTCACAAA CTCCACCCCC TCATTATCAT ATTGGCTTCA ATCCAAAATA AGGTATATTA	3180
TTGATGATG	3189

配列番号：5

配列の長さ：48

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GGGCCCGCCG CCACCATGGA TATTGAACTT GAAGTGTTAT ATGCAGGA 48

配列番号：6

配列の長さ：39

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

CTCGAGAACG CCGGACGTAG TCTTTGATC AAAACAGAAG

39

配列番号：7

配列の長さ：1884

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

ATGGATATTG AACCTGAAGT GTTATATGCA GGATATGATA GCTCTGTTCC AGACTCAACT	60
TGGAGGATCA TGACTACGCT CAACATGTTA GGAGGGCGGC AAGTGATTGC AGCAGTGAAA	120
TGGGCAAAGG CAATACCAGG TTTCAGGAAC TTACACCTGG ATGACCAAAT GACCCTACTG	180
CAGTACTCCT GGATGTTCT TATGGCATTT GCTCTGGGT GGAGATCATA TAGACAATCA	240
AGTGCAAACC TGCTGTGTT TGCTCCTGAT CTGATTATTA ATGAGCAGAG AATGACTCTA	300
CCCTGCATGT ACGACCAATG TAAACACATG CTGTATGTT CCTCTGAGTT ACACAGGCTT	360
CAGGTATCTT ATGAAGAGTA TCTCTGTATG AAAACCTTAC TGCTCTCTC TTCAGTTCCCT	420
AAGGACGGTC TGAAGAGCCA AGAGCTATTG GATGAAATTG GAATGACCTA CATCAAAGAG	480
CTAGGAAAAG CCATTGTCGA GAGGGAAGGA AACTCCAGCC AGAACTGGCA GCGGTTTTAT	540
CAACTGACAA AACTCTTGGG TTCTATGCAT GAAGTGGTTG AAAATCTCCT TAACTATTGC	600
TTCCAAACAT TTTGGATAA GACCATGAGT ATTGAATTCC CCGAGATGTT AGCTGAAATC	660
ATCACCAATC AGATACCAAA ATATTCAAAT GGAAATATCA AAAAACTTCT GTTTCATCAA	720
AAGACTACGT CCGGCGTTCC ATTTGGCATG ACACATACGAC CAACACGATC TCGGTTGTCT	780

CGGCGCACTC CGTACAGTAG GGATCGTCTA CCTCCTTTG AGACAGAAAC CCCGCCTACC	840
ATACTGGAGG ATCATCCGCT GCTGCCGAA TGAAACACTT TGACAATGCA CAACGTGAGT	900
TACGTGCGAG GTCTCCCTG CAGTGTGGGA TTTACGCTGA TTCAGGAATG GGTTGTTCCC	960
TGGGATATGG TTCTAACCGG GGAGGAGCTT GTAATCCTGA GGAAGTGTAT GCACGTGTGC	1020
CTGTGTTGTG CCAACATTGA TATCATGACG AGCATGATGA TCCATGGTTA CGAGTCCTGG	1080
GCTCTCCACT GTCATTGTT CAGTCCCAGT TCCCTGCAGT GTATAGCCGG CGGGCAGGTT	1140
TTGGCCAGCT GGTTTAGGAT GGTGGTGGAT GGCGCCATGT TTAATCAGAG GTTTATATGG	1200
TACCGGGAGG TGGTGAATTA CAACATGCCA AAAGAGGTA A TGTTTATGTC CAGCGTGT	1260
ATGAGGGGTC GCCACTTAAT CTACCTGCGC TTGTGGTATG ATGGCACGT GGGTTCTGTG	1320
GTCCCCGCCA TGAGCTTTGG ATACAGCGCC TTGCACTGTG GGATTITGAA CAATATTGTG	1380
GTGCTGTGCT GCAGTTACTG TGCTGATTAA AGTGAGATCA GGGTGCCTG CTGTGCCCGG	1440
AGGACAAGGC GCCTTATGCT CGGGCGGTG CGAACATCG CTGAGGAGAC CACTGCCATG	1500
TTGTATTCCCT GCAGGACGGA GCGGCAGCGG CAGCAGTTA TTGCGCGCT GCTGCAGCAC	1560
CACCGCCCTA TCCTGATGCA CGATTATGAC TCTACCCCCA TGTAGGCCTG GACTTCTCCT	1620
TCGCCGCCCG TTAAGCAACC GCAAGTTGGA CAGCAGCCTG TGGCTCAGCA GCTGGACAGC	1680
GACATGAACT TAAGTGAGCT GCCCGGGGAG TTTATTAATA TCACTGATGA GCGTTGGCT	1740
CGACAGGAAA CCGTGTGGAA TATAACACCT AAGAATATGT CTGTTACCCA TGATATGATG	1800
CTTTTTAAGG CCAGCCGGGG AGAAAGGACT GTGTACTCTG TGTGTTGGGA GGGAGGTGGC	1860
AGGTTGAATA CTAGGGTTCT GTGA	1884

配列番号：8

配列の長さ：534

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

## 配列の種類：タンパク質

## 配列

Met	Asp	Ile	Glu	Pro	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ser	Ser	Val
1					5				10				15		
Pro	Asp	Ser	Thr	Trp	Arg	Ile	Met	Thr	Thr	Leu	Asn	Met	Leu	Gly	Gly
						20			25				30		
Arg	Gln	Val	Ile	Ala	Ala	Val	Lys	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Phe
						35			40			45			
Arg	Asn	Leu	His	Leu	Asp	Asp	Gln	Met	Thr	Leu	Leu	Gln	Tyr	Ser	Trp
						50			55			60			
Met	Phe	Leu	Met	Ala	Phe	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Arg	Gln	Ser
						65			70		75		80		
Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Cys	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Ile	Asn	Glu	Gln
						85			90			95			
Arg	Met	Thr	Leu	Pro	Cys	Met	Tyr	Asp	Gln	Cys	Lys	His	Met	Leu	Tyr
						100			105			110			
Val	Ser	Ser	Glu	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Val	Ser	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Leu
						115			120			125			
Cys	Met	Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Gly	Leu	
						130			135			140			
Lys	Ser	Gln	Glu	Leu	Phe	Asp	Glu	Ile	Arg	Met	Thr	Tyr	Ile	Lys	Glu
						145			150			155			160
Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Val	Lys	Arg	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Trp
						165			170			175			
Gln	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	His	Glu	Val
						180			185			190			
Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Gln	Thr	Phe	Leu	Asp	Lys	Thr
						195			200			205			
Met	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Glu	Met	Leu	Ala	Glu	Ile	Ile	Thr	Asn	Gln
						210			215			220			
Ile	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asn	Gly	Asn	Ile	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	His	Gln
						225			230			235			240
Lys	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Gly	Met	Thr	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg
						245			250			255			

Ser Arg Leu Ser Arg Arg Thr Pro Tyr Ser Arg Asp Arg Leu Pro Pro  
 260 265 270  
 Phe Glu Thr Glu Thr Arg Ala Thr Ile Leu Glu Asp His Pro Leu Leu  
 275 280 285  
 Pro Glu Cys Asn Thr Leu Thr Met His Asn Val Ser Tyr Val Arg Gly  
 290 295 300  
 Leu Pro Cys Ser Val Gly Phe Thr Leu Ile Gln Glu Trp Val Val Pro  
 305 310 315 320  
 Trp Asp Met Val Leu Thr Arg Glu Glu Leu Val Ile Leu Arg Lys Cys  
 325 330 335  
 Met His Val Cys Leu Cys Cys Ala Asn Ile Asp Ile Met Thr Ser Met  
 340 345 350  
 Met Ile His Gly Tyr Glu Ser Trp Ala Leu His Cys His Cys Ser Ser  
 355 360 365  
 Pro Gly Ser Leu Gln Cys Ile Ala Gly Gly Gln Val Leu Ala Ser Trp  
 370 375 380  
 Phe Arg Met Val Val Asp Gly Ala Met Phe Asn Gln Arg Phe Ile Trp  
 385 390 395 400  
 Tyr Arg Glu Val Val Asn Tyr Asn Met Pro Lys Glu Val Met Phe Met  
 405 410 415  
 Ser Ser Val Phe Met Arg Gly Arg His Leu Ile Tyr Leu Arg Leu Trp  
 420 425 430  
 Tyr Asp Gly His Val Gly Ser Val Val Pro Ala Met Ser Phe Gly Tyr  
 435 440 445  
 Ser Ala Leu His Cys Gly Ile Leu Asn Asn Ile Val Val Leu Cys Cys  
 450 455 460  
 Ser Tyr Cys Ala Asp Leu Ser Glu Ile Arg Val Arg Cys Cys Ala Arg  
 465 470 475 480  
 Arg Thr Arg Arg Leu Met Leu Arg Ala Val Arg Ile Ile Ala Glu Glu  
 485 490 495  
 Thr Thr Ala Met Leu Tyr Ser Cys Arg Thr Glu Arg Arg Gln Gln  
 500 505 510  
 Phe Ile Arg Ala Leu Leu Gln His His Arg Pro Ile Leu Met His Asp  
 515 520 525  
 Tyr Asp Ser Thr Pro Met  
 530

(58)

特表平11-504502

【図1】

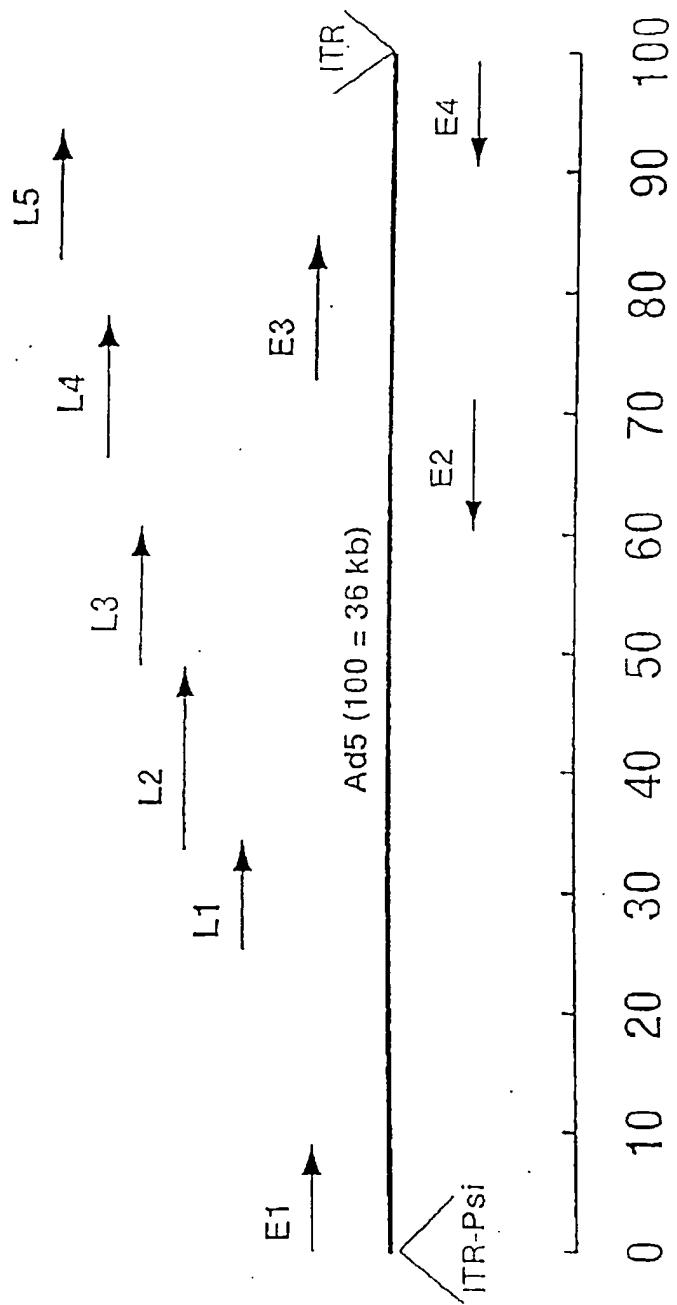


Figure 1

【図2】

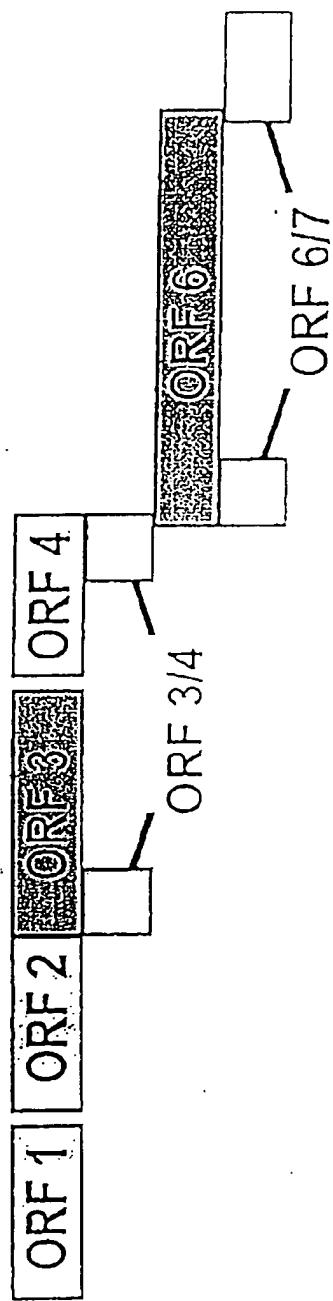


Figure 2

【図3】

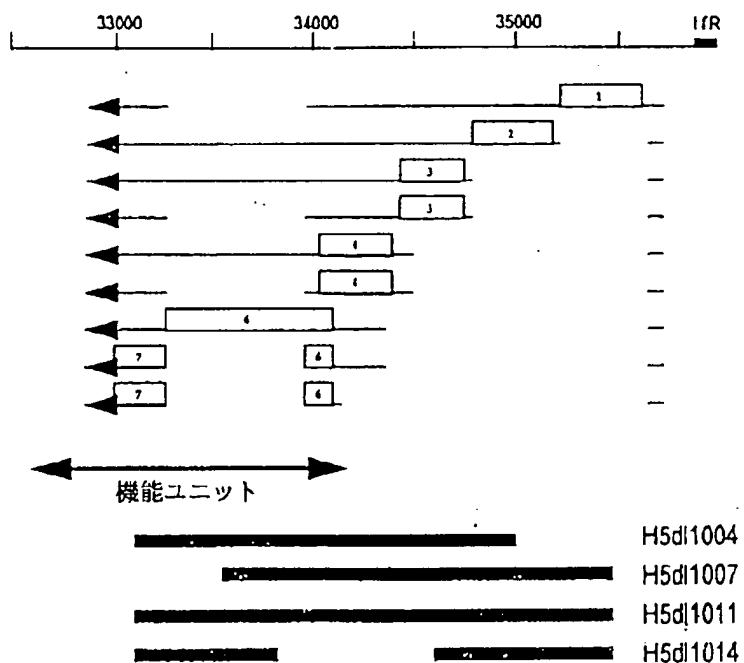


Figure 3

【図4 A】

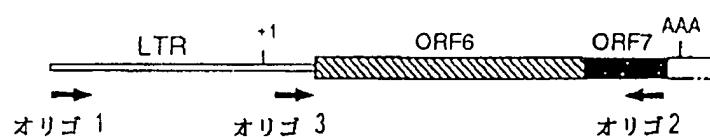


Figure 4A

【図4】

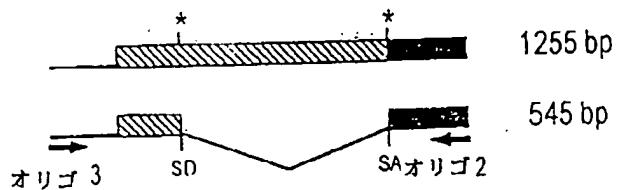


Figure 4B

【図5】

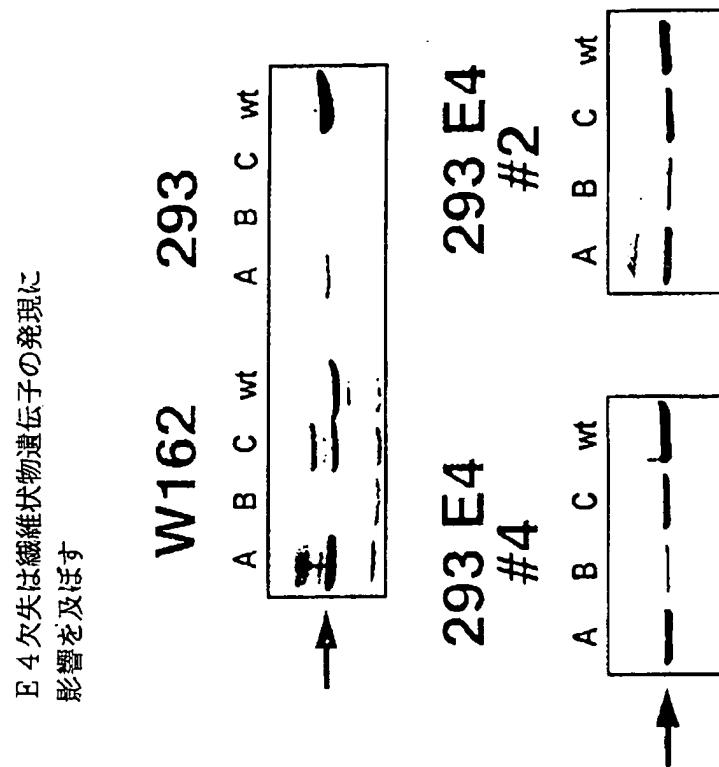


Figure 5

【図6】

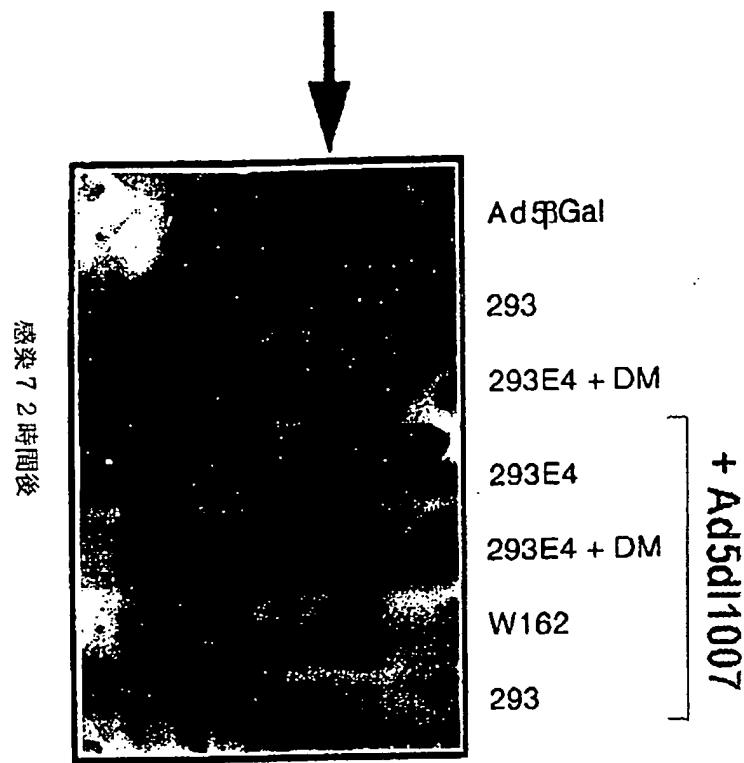


Figure 6

【図7】

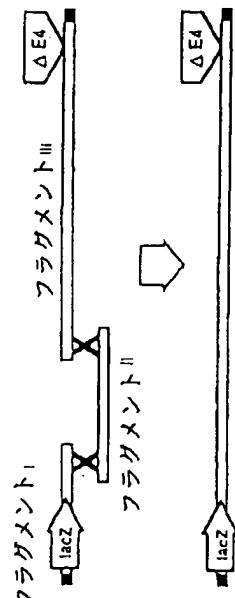


Figure 7

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年3月6日

【補正内容】

請求の範囲

1. 読取り枠ORF6をもつアデノウイルスのゲノムのE4領域の一部を機能プロモーターの制御下に細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。
2. E4領域の前記部分が読取り枠ORF6及びORF6/7を含むことを特徴とする請求項1に記載の細胞。
3. E4領域の前記部分がC亜属のヒトアデノウイルスのゲノムに由来することを特徴とする請求項1又は2に記載の細胞。
4. E4領域がアデノウイルスAd2又はAd5のゲノムに由来することを特徴とする請求項3に記載の細胞。
5. プロモーターが誘導型プロモーターであることを特徴とする請求項1から4のいずれか一項に記載の細胞。
6. プロモーターがMMTVプロモーター及びその誘導体から選択されることを特徴とする請求項5に記載の細胞。
7. E4領域の前記部分が特異的リガンドの認識に関与する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合された読取り枠ORF6を含むことを特徴とする請求項1から5のいずれか一項に記

載の細胞。

8. 前記ドメインがグルココルチコイドレセプターのホルモン結合ドメイン(HBD-GCR)であることを特徴とする請求項7に記載の細胞。
9. その特異的リガンドの認識に関与する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合される読取り枠ORF6がグルココルチコイドに応答する誘導型プロモーターの制御下におかれることを特徴とする請求項8に記載の細胞。
10. 前記プロモーターがGRE5プロモーターであることを特徴とする請求項9に記載の細胞。

11. E 1 領域をトランス相補する細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。
12. 293細胞系に由来することを特徴とする請求項11に記載の細胞。
13. K B、HeLa、MDCK、Vero又はgmDBP6細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。
14. 初代培養細胞に由来することを特徴とする請求項1から10のいずれか一項に記載の細胞。
  
15. Ad5のゲノムのヌクレオチド34115～32490に対応するBgl I I-Bgl I Iフラグメントを細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。
16. 293細胞系の細胞であることを特徴とする請求項15に記載の細胞。
17. プラスミドpORF6Genにより形質転換された293系の細胞であることを特徴とする請求項15又は16に記載の細胞。
18. Ad5のゲノムのヌクレオチド34115～33126に対応するBgl I I-Pvu IIフラグメントを細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。
19. その末端の一方でグルココルチコイドレセプターのホルモン結合ドメインに融合されたアデノウイルスゲノムの読み取り枠ORF6を含むキメラ遺伝子を細胞ゲノムに挿入して含むことを特徴とする、欠損アデノウイルスの製造に使用可能な細胞。
20. プラスミドpGG0により形質転換された293系の細胞であることを特徴とする請求項19に記載の細胞。
  
21. 読取り枠ORF6をもつアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を誘導型異種プロモーターの制御下に含むプラスミド。
22. アデノウイルスゲノムのE4領域の前記部分が読み取り枠ORF6及びORF6/7をもつことを特徴とする請求項21に記載のプラスミド。
23. プラスミドpORF6Genであることを特徴とする請求項22に記載の

プラスミド。

24. 特異的リガンドの認識に関する核レセプターのドメインと翻訳段階で融合されたアデノウイルスゲノムの読み取り枠ORF6を含むことを特徴とするプラスミド。

25. プラスミドpGG0であることを特徴とする請求項24に記載のプラスミド。

26. 少なくともE4領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造のための請求項1から20のいずれか一項に記載の細胞の使用。

27. 少なくともE4領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造方法であって、前記組換え欠損アデノウイルスのゲノムの種々の領域を付与する1種以上のプラスミドで請求項1から20のいずれか一項に記載の培養細胞を形質転換させた後、産

生されたウイルスを回収することを特徴とする前記方法。

28. E1及びE4領域を欠損する組換えアデノウイルスの製造のための請求項27に記載の方法。

29. 培養細胞が請求項15から20のいずれか一項に記載の培養細胞であることを特徴とする請求項27又は28に記載の方法。

30. E1領域の全部又は一部の欠失と、E4領域のヌクレオチド34801～34329及び34115～33126の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ORF3, ORF6。

31. E1領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠ORF1を除くE4領域の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ΔE4, ORF1。

32. E1領域における欠失と、5'末端が読み取り枠ORF7に含まれ且つ3'末端が読み取り枠ORF2内に位置するフラグメントの欠失を含むことを特徴とする請求項31に記載の組換え欠損アデノウイルス。

33. E4領域にヌクレオチド33093～35053の欠失を含むことを特徴とする請求項32に記載の組換え欠損アデノ

ウイルス。

34. E1領域の全部又は一部の欠失と、読み取り枠ORF4を除くE4領域の欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ΔE4, ORF4。

35. E1領域における欠失と、5'末端が読み取り枠ORF7に含まれ且つ3'末端が読み取り枠ORF6内に位置するフラグメントの欠失と、5'末端が読み取り枠ORF3に含まれ且つ3'末端が読み取り枠ORF1又はE4プロモーター領域内に位置するフラグメントの欠失を含むことを特徴とする請求項34に記載の組換え欠損アデノウイルス。

36. E1領域における欠失と、ヌクレオチド33093(SmaI)～33695の欠失と、ヌクレオチド34634～35355(SmaI)の欠失を含むことを特徴とする請求項35に記載の組換え欠損アデノウイルス。

37. E1領域の全部又は一部の欠失と、ヌクレオチド32720～35835、33466～35355又は33093～35355の欠失から選択されるE4領域の全体に及ぶ欠失を含む組換え欠損アデノウイルスΔE1, ΔE4。

38. 組換えAAVの製造のための請求項1から20のいずれか一項に記載の細胞の使用。

39. 少なくとも読み取り枠ORF6を含むアデノウイルスゲノムのE4領域の全部又は一部を細胞ゲノムに挿入して含む細胞の請求項38に記載の使用。

40. 少なくとも読み取り枠ORF6を含むアデノウイルスゲノムのE4領域の一部を細胞ゲノムに挿入して含む培養細胞に、AAV-ITRに挟まれた着目核酸をもつAAVプラスミドと、ヘルパーアデノウイルスと、AAV-Rep及びCap機能とを導入し、その後、產生されたウイルスを回収することを特徴とする組換えAAVの製造方法。

41. 培養細胞がE4領域の全体を含む培養細胞であることを特徴とする請求項40に記載の方法。

42. 培養細胞が読み取り枠ORF6と場合により読み取り枠ORF6/7を含む培養細胞であることを特徴とする請求項40に記載の方法。

43. 培養細胞が請求項1から20のいずれか一項に記載の培養細胞であること

を特徴とする請求項42に記載の方法。

44. ヘルパー・アデノウイルスがE4領域を欠損するヒトアデノウイルスであることを特徴とする請求項40に記載の方法。

45. ヘルパー・アデノウイルスがE1及びE4領域を欠損するヒトアデノウイルスであることを特徴とする請求項44に記載の方法。

46. 欠損ヘルパー・アデノウイルスが好ましくはCAV2株から選択されるイヌアデノウイルスであることを特徴とする請求項40に記載の方法。

47. 前記rep及びcap機能が、AAVrep及びcap領域をもつプラスミドで細胞を同時トランスフェクトすることにより付与されることを特徴とする請求項40に記載の方法。

48. プラスミドが核酸集密化剤とカチオン脂質の存在下でトランスフェクトされることを特徴とする請求項40に記載の方法。

49. アデノウイルスのE1及びE4機能をトランス相補する培養細胞に、AAV-ITRに挟まれた着目核酸をもつAAVプラスミドと、AAVrep及びcap領域をもつプラスミドをポリカチオン脂質と集密化剤の存在下で同時トランスフェクトし、E1領域及びE4を欠損するAd2又はAd5由来のヒトアデノウイルスとCAV2由来のイヌアデノウイルスから選択されるヘルパー・アデノウイルスを前記培養細胞に同時感染

させ、その後、產生されたウイルスを回収することを特徴とする組換えAAVの製造方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int'l Application No PCT/FR 96/00088
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 C12N7/04 C07K14/075		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 January 1995 cited in the application see page 21, line 20 - line 26; claims 1-28	1-6, 11-14, 26-30 15-18,38
P,Y	---	
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, 1989, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND. pages 3037-3048, XP002003252 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids" see page 3046, line 11 - line 17	21-23, 26,27
Y	---	1-6, 11-18, 28-30,38
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
'E' earlier document but published on or after the international filing date		
'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art		
Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  20 May 1996	Date of mailing of the international search report  04.06.96	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5878 Patenttaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 rpo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hornig, H	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 96/00088

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 28152 (TRANSGENE) 8 December 1994 see page 13, line 29 - line 33; claim 40; figures 1-11	38 1-6, 11-18, 21-23, 26-30
	see page 13, line 19 - line 21 ---	
X	VIROLOGY, vol. 194, 1993, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 50-58. XP002003253 K. OHMAN ET AL.: "Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilities tripartite leader mRNA accumulations" see page 50, line 7 - line 10 see page 50, right-hand column, line 6 - page 51, left-hand column, line 40 ---	21-23
P,X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 3, March 1995. NATIONAL HELENIC RES. FOUNDATION, ATHENS, GREECE, pages 663-668, XP000562776 K. OHMAN ET AL.: "Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation" see the whole document ---	21-23
P,Y	FR,A,2 707 664 (CNRS) 20 January 1995  see page 7, line 26 - page 10, line 12 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30, 38
Y	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994  see page 18, line 6 - line 19 see page 58, line 30 - line 34 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30, 38
Y	VIROLOGY, vol. 193, no. 2, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 794-801, XP002003255 E. BRIDGE ET AL.: "Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis" cited in the application see page 799, right-hand column, line 40 - page 800, left-hand column, line 4 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30, 38
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 96/00088

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DNA, vol. 8, no. 2, 1989, MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 127-133, XP000565540 M.S.H. KO AND T. TAKANO: "A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors" see the whole document ---	7-10, 19, 20, 24, 25
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 3, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 1440-1449, XP002003256 C. HEMSTRÖM ET AL.: "Adenovirus E4-dependent activation of the early E2 promoter is insufficient to promote early-to-late-phase transition" en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 3, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 833-838, XP002003257 D.H. WINBERGER AND G. KETNER: "Adenoviral region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression" cited in the application en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 63, no. 2, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 631-638, XP002003258 E. BRIDGE AND G. KETNER: "Redundant control of adenovirus late gene expression" cited in the application see page 637, left-hand column, line 13 - right-hand column, line 12 ---	1-38
A	PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 80, NATL. ACAD. SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 5383-5386, XP002003259 D.H. WEINBERG AND G. KETNER: "A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of adenovirus type 2" cited in the application en entier ---	1-38
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 96/00088

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Claim or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, January 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002003260 E.J. KREMER AND M. PERRICADET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" see the whole document ---	39-50
P,A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, - February 1995 HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002003261 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI: "AAV as a viral vector for human gene therapy" see the whole document	39-50
P,A	WO,A,95 20671 (RHONE POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICADET MICHEL) 3 August 1995 see the whole document	39-50
P,A	WO,A,95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 see the whole document	39-50
P,A	WO,A,95 23867 (RHONE-POULENC RORER) 8 September 1995 see the whole document	39-50
T	JOURNAL OF VIROLOGY 70 (1). 1996. 559-565. ISSN: 0022-538X, January 1996, XP002003262 YEH P ET AL: "Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit." see the whole document	1-50
T	J. VIROLOGY. vol. 70, no. 5, May 1996, AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 3227-3234, XP002003300 F.K. FERRARI ET AL.: "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vector" see the whole document	1-50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 96/00088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664 FR-A- 2718749 AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CN-A- 1113390 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 JP-T- 8501703 NO-A- 950939 NZ-A- 269156 PL-A- 308122 ZA-A- 9405012	20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 13-12-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 27-02-96 10-03-95 26-03-96 24-07-95 20-02-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686 AU-B- 6850394 CA-A- 2141212 EP-A- 0652968 JP-T- 7509616	02-12-94 20-12-94 08-12-94 17-05-95 26-10-95
FR-A-2707664	20-01-95	AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CN-A- 1113390 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 WO-A- 9502697 JP-T- 8501703 NO-A- 950939 NZ-A- 269156 PL-A- 308122 ZA-A- 9405012	13-02-95 26-01-95 13-12-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 26-01-95 27-02-96 10-03-95 26-03-96 24-07-95 20-02-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994 CA-A- 2145641 EP-A- 0673431	22-06-94 09-06-94 27-09-95
WO-A-9520671	03-08-95	FR-A- 2716682 AU-B- 1539595	01-09-95 15-08-95

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Int'l Application No
PCT/FR 96/00088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9506743	09-03-95	AU-B-	7565694	22-03-95
WO-A-9523867	08-09-95	FR-A- AU-B-	2716893 1852695	08-09-95 18-09-95

---

フロントページの続き

- (31) 優先権主張番号 95/10541  
(32) 優先日 1995年9月8日  
(33) 優先権主張国 フランス(FR)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), AP(KE, LS, MW, SD  
, SZ, UG), UA(AZ, BY, KG, KZ, RU,  
TJ, TM), AL, AM, AU, BB, BG, BR,  
CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, J  
P, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD  
, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO,  
SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, V  
N  
(72) 発明者 ペリコデ, ミシエル  
フランス国、エフー28320・エクロスヌ、  
リュ・ドウ・シヤルトル、31  
(72) 発明者 ビニユ, エマニユエル  
フランス国、エフー94200・イブリーシュ  
ールセーヌ、リュ・ジヤンールガル、  
60  
(72) 発明者 イエー, パトリス  
フランス国、エフー75005・パリ、リュ・  
ラセペード、11・ビス  
(72) 発明者 プロスト, エドワール  
フランス国、エフー94370・シュシー・ア  
ン・ブリ、リュ・マレシャル・ドウ・ラト  
ル・ドウ・タシニー・20